

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C12P 21/02

C12P 21/06 C12N 15/63



[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97109693.7

[43]公开日 1997年12月10日

[11]公开号 CN 1167155A

[22]申请日 97.3.4

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所

[30]优先权

代理人 段承恩

[32]96.3.4 [33]JP[31]70906 / 96

[71]申请人 三得利公司

地址 日本大阪

[72]发明人 铃木雄司 孙田浩二 增田丰文

权利要求书 2 页 说明书 42 页 附图页数 16 页

[54]发明名称 使用加工酶的嵌合蛋白质的切断方法

[57]摘要

提供一种包含目的蛋白质的嵌合蛋白质，该嵌合蛋白质利用加工酶能容易地开裂，能高效率地回收目的蛋白质，是以下式表示的嵌合蛋白质：

A-L-B。

式中，A 是保护肽，B 是目的肽，L 是接头肽，在其 C 末端部分具有序列 X1-X2- (Trp、Lys 或 Arg) -Arg (式中，X1 和 X2 是任意的氨基酸)，而在 N 末端具有富有 His 的部分。

权 利 要 求 书

1、由下式表示的嵌合蛋白质，



式中， A 是保护肽；

B 是目的肽；

L 是接头肽，在其 C 末端部分具有序列： X 1 - X 2 - (P r o 、 L y s 或 Arg) - Arg (式中， X 1 和 X 2 是任意的氨基酸) ，而且在 N 末端具有富有 His 的部分。

2、权利要求 1 所述的嵌合蛋白质，其中，上述 N 末端的富有 His 的部分具有序列： [(His) 4 - Pro - Gly] n (式中， n 是 1 - 6) 。

3、权利要求 1 或 2 所述的嵌合蛋白质，其中，在上述 N 末端部分的氨基酸序列和上述 C 末端部分的氨基酸序列之间存在 1 - 5 个任意的氨基酸。

4、权利要求 1 - 3 中任一项所述的嵌合蛋白质，其中， X 1 是 Arg 、 Lys 或 His ，而 X 2 是 His 或 Phe 。

5、权利要求 1 - 4 中任一项所述的嵌合蛋白质，其中， A 是不含氨基酸序列 Pro - Arg 、 Arg - Arg 和 Lys - Arg 的多肽。

6、权利要求 1 - 4 中任一项所述的嵌合蛋白质，其中， A 是含有氨基酸序列 Pro - Arg 、 Arg - Arg 或 Lys - Arg 的多肽的场合时，该氨基酸序列中至少一种氨基酸被其他氨基酸取代，以便在 A 中不含有该氨基酸序列。

7、权利要求 1 - 6 中任一项所述的嵌合蛋白质，其中， A 是 220 氨基酸残基以下的多肽。

8、权利要求 7 所述的嵌合蛋白质，其中， A 是来自大肠杆菌的 β -

半乳糖苷酶的N末端侧的1位氨基酸至97位、117位或139位氨基酸的肽。

9、权利要求1-8中任一项所述的嵌合蛋白质，其中，A中的半胱氨酸残基被其他氨基酸取代。

10、权利要求9所述的嵌合蛋白质，其中，上述其他氨基酸是丝氨酸残基。

11、权利要求1所述的嵌合蛋白质，其中，B是人副甲状腺激素或其衍生物。

12、权利要求11所述的嵌合蛋白质，其中，上述人副甲状腺激素衍生物是具有从天然的人副甲状腺激素的N末端的1位或3位氨基酸残基至31位、34位、37位、38位或84位氨基酸残基的序列的片断，或者是在它们的C末端附加Gly的片段。

13、权利要求1所述的嵌合蛋白质，其中，B是GLIP-1或其衍生物。

14、权利要求1-13中任一项所述的嵌合蛋白质的制造方法，其特征在于，以包含编码该嵌合蛋白质的DNA的表达载体转化宿主细胞，培养所得到的转化体，从该培养物中提取上述嵌合蛋白质。

15、目的肽(B)的制造方法，其特征在于，使加工酶作用于权利要求1-13中任一项所述的嵌合蛋白质，切断接头肽(L)的C末端与目的肽(B)的N末端之间的肽键，得到目的肽(B)。

16、权利要求15所述的方法，其特征是，上述的加工酶是Kex2蛋白酶、フリン(Furin)、前体转变酶1/3(Proteinase 1/3)或者前体转变酶2(Proteinase 2)、或者它们的衍生物。

17、权利要求14-16中任一项所述的方法，其特征是，在得到目的肽(B)时使用等电点沉淀处理。

说 明 书

使用加工酶的嵌合蛋白质的切断方法

本发明是关于在生产生理活性肽或其前体时，成为底物的嵌合蛋白质及其生产方法，本发明进而是关于使该生理活性肽从该嵌合蛋白质中游离、精制的方法。

正在利用嵌合蛋白质表达法尝试许多的肽生产方法。作为目的肽的游离方法，正在使用利用化学的或酶的切断。作为酶有特异地切断赖氨酸残基的C末端侧的肽键的赖酰胺肽链内切酶（无色杆菌蛋白酶I）、特异地切断谷氨酸残基的C末端侧的葡萄球菌蛋白酶V 8等。作为化学方法有亚硝酸引起天冬氨酸残基开裂、CNBr引起甲硫氨酸残基开裂等。

化学方法不能避免目的肽的修饰，在切断后的目的肽的精制中，必须从各种类似物中进行目的肽的精制。而酶切断方法特异性高、也可在较温和的条件下进行切断，因此目的肽的精制是容易的，但是是否可能利用这些酶，要依赖于目的肽的氨基酸序列。因此存在不能选择现有蛋白酶，而寻求通用性高的切断酶。

在生物体内生成肽激素及其前体时，用酶（加工酶）特异地切断该肽的前体多肽。在这种酶中已经知道前体转变酶1 / 3 (PC 1 / 3)、前体转变酶2 (PC 2)、フリン (furin) 等，在啤酒酵母 (*S accharomyces cerevisiae*) 的 α -因子 (α -mating factor) 生成时发挥功能的Kex 2蛋白酶也是其中一种。在从嵌合蛋白质中切出目的肽时如果直接使用这些加工酶，能不损害肽激素，而且能够适用于各种各样肽，正期待像这样的生产方法。

本发明人已报导过以来自大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的多肽作为保护肽，选择合适的接头肽，在大肠杆菌体内以不溶性包涵体生产与目的肽嵌合的蛋白质的方法（特开平5-328992）。该嵌合蛋白质用尿素等变性剂溶解，成为加工酶的底物。

另一方面，本发明人等已报导过通过变化其基因、作为可溶性酶（分泌型Kex2衍生物）生产来自膜结合型酶的啤酒糖酵母的Kex2蛋白酶的方法（“分泌型Kex2衍生物的制造方法”为题的平成8年3月4日申请的说明书）。但是，在以该酶作为加工酶使用时，未涉及关于成为其底物的嵌合蛋白质的设计。

因此，正期待开发在大量培养下、在大肠杆菌体内作为包涵体能效率良好地生产、在加工酶有效地作用条件下能容易溶化的嵌合蛋白质的设计、生产方法，进而期待开发利用加工酶从嵌合蛋白质中有效地切断目的肽那样地设计、生产切断部位附近的氨基酸序列的方法。另外，同时也期待开发以高回收率将像上述那样生产的生理活性肽精制至99%以上的纯度的通用性的高精制方法。

因此，本发明想要提供在使用如分泌型Kex2衍生物的加工酶、生产生理活性肽时成为底物的嵌合蛋白质的设计、生产方法及该肽的精制方法。

本发明人等研究了解决上述课题的方法，结果初次清楚以下事实，从而完成了本发明。即1) 在嵌合蛋白质中插入富有His的序列，例如含有 $\{(His)_4-Pro-Gly\}_n$ ($n=1-6$) 的接头肽，与产量增加和在如分泌型Kex2衍生物的加工酶反应条件下的溶解性提高有关的事实，2) 以接头内的加工酶作用部位的氨基酸序列作为X1-X2-(Lys/Arg)-Arg，希望作为X1选择Lys、Arg或His，作为X2选择His或Phe，是反应性高的底物条件的事实，进而3) 反应后，使反应液的pH变成弱酸性，再进行稀释，使变性剂的浓度降低，使目的肽以外的成分的大部分沉淀，通过离心分离或压滤，在上清液中能够回收95%以上的目的肽，然后例如单独或者最好组合使用阳离子交换色谱法、低压反相色谱法、反相HPLC等能够高纯度且高回收率地精制目的肽的事实。

因此本发明提供以下式表示的嵌合蛋白质，A-L-B(式中，A是保护肽；B是目的肽；而L是接头肽，在其C末端具有序列X1-X2-(Lys或Arg)-Arg(式中，X1和X2是任意的氨基酸)，而在

N末端具有富有His的部分。] 作为在上述N末端富有His的部分，序列：[(His)₄-Pro-Gly]_n（式中，n是1-6）是理想的，并且X₁是Arg、Lys或者His，而且X₂是His或者Phe为佳。进而，在上述N末端部分的氨基酸序列和上述C末端部分的氨基酸序列之间也可以存在1-5个任意的氨基酸。

本发明还提供以下述为特征的方法，即在上述的嵌合蛋白质的制造方法中，用含有编码该嵌合蛋白的DNA的表达载体转化宿主细胞，培养得到的转化体，从该培养物中提取上述嵌合蛋白质。

本发明又提供以下述为特征的方法，即在上述目的肽（B）的制造方法中，使加工酶作用于上述的嵌合蛋白质，而切断接头肽（L）的C末端和目的肽（B）的N末端之间的肽键，得到目的肽（B）。

上述的方法，在优选的方式中，用能够表达编码嵌合蛋白质的基因的载体转化宿主细胞，培养得到的转化体，再破碎该转化体，得到包涵体的不溶性级分，用可溶化剂处理该不溶性级分，使包涵体中的嵌合蛋白质溶化，用如分泌型Kex2衍生物的加工酶切断该溶化的嵌合蛋白质的上述接头氨基酸残基的C末端和上述目的肽的N末端之间的肽键，从而切出该目的肽，通过沉淀处理、阳离子交换色谱法、低压反相色谱法和反相HPLC精制该目的肽。

对附图的简要说明

图1表示在合成hProPTH(1-84)基因制作中使用的合成低聚物的序列。

图2表示合成hProPTH(1-84)基因的制作方法。

图3是表示质粒pG210S(S/X)的制作方法的图。P_{lac}表示大肠杆菌的乳糖操纵子的启动子，T_{trp}表示大肠杆菌的TrpE的减弱终止区。

图4表示表达嵌合蛋白质βGal-139S(FM)PPH84的质粒pGP#139的制作方法。

图5表示表达嵌合蛋白质βGal-139S(FM)PPH84的

质粒 p G P # 1 9 P P 3 4 的制作方法。

图 6 是表示表达嵌合蛋白质 β G a 1 - 1 1 7 S P P H 3 4 和 β G a 1 - 1 1 7 S n H P P 3 4 的质粒 p G 1 1 7 S P P H 3 4 和 p G 1 1 7 S n H P P H 3 4 的制作方法的前半部分的图 ($n = 1 - 6$)。使引物 S 0 5 转变成 S 0 4 制成 p G 9 7 S P P H 3 4 和 p G 9 7 S n H P P H 3 4，使引物 S 0 5 转变成 S 0 6，制成 p G 1 3 9 S P P H 3 4 和 p G 1 3 9 S n H P P H 3 4。

图 7 是表示表达嵌合蛋白质 β G a 1 - 1 1 7 S P P H 3 4 和 β G a 1 - 1 1 7 S n H P P 3 4 的质粒 p G 1 1 7 S P P H 3 4 和 p G 1 1 7 S n H P P H 3 4 的制作方法的后半部分的图 ($n = 1 - 6$)。使引物 S 0 5 转变成 S 0 4 制成 p G 9 7 S P P H 3 4 和 p G 9 7 S n H P P H 3 4，使引物 S 0 5 转变成 S 0 6，制成 p G 1 3 9 S P P H 3 4 和 p G 1 3 9 S n H P P H 3 4。

图 8 是表示调查聚组氨酸接头 $\{(H i s)_4 - P r o - G l y\}_n$ ($n = 1 - 6$) 对嵌合蛋白产量影响的 SDS - PAGE 的结果的图。图中 4 H 表示组氨酸残基是 4 个即 $n = 1$ 。

图 9 是表示聚组氨酸接头 $[(H i s)_4 - P r o - G l y]_n$ ($n = 1 - 6$) 对由 K e x 2 - 6 6 0 引起的 h P T H (1 - 3 4) 的切出效率影响的图。横轴表示以 β G a 1 - 1 1 7 S P P H 3 4 的 K c a t 值作为 1 时的相对值。

图 1 0 是表示 K e x 2 蛋白酶的识别部位 P 3 的氨基酸对由 K e x 2 - 6 6 0 引起的 h P T H (1 - 3 4) 的切出效率影响的图。P 4 的氨基酸固定在缬氨酸残基上，取代 P 3 部位的氨基酸。横轴表示以 β G a 1 - 1 1 7 S 4 H V K P H 3 4 的 K c a t 值作为 1 时的相对值。

图 1 1 是表示 K e x 2 蛋白酶的识别部位 P 4 的氨基酸对由 K e x 2 - 6 6 0 引起的 h P T H (1 - 3 4) 的切出效率影响的图。P 3 的氨基酸固定在组氨酸残基上，取代 P 4 部位的氨基酸。横轴表示以 β G a 1 - 1 1 7 S 4 H V K P H 3 4 的 K c a t 值作为 1 时的相对值。

图 1 2 是表示 β G a 1 - 1 1 7 K S 4 H R H P H 3 4 基因的表达载

体 p G K S P H 3 4 的结构的示意图。 β Gal - 1 1 7 k s 是 β Gal - 1 1 7 S 的 1 4 位的精氨酸残基被赖氨酸残基取代的肽。

图 1 3 是表示质粒 p G 2 1 0 S h C T (G) 的制作方法的图。

图 1 4 表示 H G L P - 1 (7 - 3 7) 基因 (DNA (1)) 制作用的合成低聚核苷酸的碱基序列，及以 p G K S P H 3 4 作为模板用的引物的碱基序列。

图 1 5 表示质粒 p G 1 1 7 S 4 H G P 的制作过程。

图 1 6 表示 h G L P - 1 的精制的分布图，A 表示 K e x 2 反应后的结果，B 表示酸性沉淀上清液的结果，C 表示阳离子交换柱后的结果，D 表示低压逆相柱后的结果。峰 1 表示 h G L P - 1 (7 - 3 7)，峰 2 表示 h G L P - 1，峰 3 表示保护肽，峰 4 表示嵌合蛋白质。

根据本发明的方法，用加工酶切断由上述保护肽、接头的生理活性肽（目的肽）组成的嵌合蛋白质，能够制造生理活性肽。作为像这样的肽，可举出人副甲状腺激素 (h P T H (1 - 8 4)) 及其衍生物 (h P T H (1 - 3 4)、h P T H (1 - 3 4)、z h P T H (1 - 3 8))、人副甲状腺激素的其他衍生物 (h P T H (1 - 3 1) G l y、h P T H (1 - 3 4) G l y、h P T H (1 - 3 7) G l y、h P T H (1 - 3 8) G l y、h P T H (3 - 8 4)、h P T H (3 - 3 4)、h P T H (3 - 3 7)、h P T H (3 - 3 8))、细胞增殖因子、降钙素及其前体、胰高血糖素样的蛋白质 1 (G l u c a g o n - l i k e p e p t i d e 1: GLIP - 1) 及其衍生物 (GLIP - 1 (1 - 3 7) GLIP - 1 (7 - 3 7)、GLIP - 1 (7 - 3 6) NH₃ 等)，但并不限于这些。

另外，作为加工酶，可以使用 K e x 2 蛋白酶、フリン (F u r i n)、前体转变酶 1 (P C 1) 或前体转变酶 2 (P C 2) 或者它们的衍生物等，但并不限于这些。在本发明中，特别是除去 K e x 2 酶的 C 末端而得到的分泌型 K e x 2 衍生物是优先选择的。

在本发明中的保护肽，其大小是 2 2 0 个氨基酸以下的肽为佳。例如由从大肠杆菌 β 半乳糖苷酶的 N 末端的 1 位至 9 0 - 2 1 0 个氨基酸组成

的肽为佳。更好是从大肠杆菌 β 半乳糖苷酶的N末端的1位至97位、117位或139位组成的肽。并且更好是这些肽的半胱氨酸残基被丝氨酸残基取代，最好是14位的缬氨酸残基被赖氨酸残基取代。另外，在保护肽中，最好含有通过加工酶识别的序列，例如 Arg - Arg、Lys - Arg等，在保护肽中有该识别序列时，以其他的氨基酸取代像这样的识别序列中的至少一个氨基酸，通过形成不被加工酶识别的序列，能够防止利用加工酶的切断。

作为用于改善嵌合蛋白质的溶解性的接头氨基酸，以亲水性者为佳。因目的肽的种类不同，嵌合蛋白质的电荷变化，因为有造成包涵体生产率降低的情况，所以作为亲水性氨基酸，希望使用在是包涵体生产场所的菌体内的生理 pH（中性）附近保持缓冲能力的组氨酸残基。进而变性、可溶化后，以使接头部分的二级结构加宽为目的，希望插入 Pro - Gly。最好是要能适应多种的生理活性肽那样，准备编码 (His)4 - Pro - Gly 的合成DNA片段，适当重复插入编码保护肽的DNA片段，形成 { (His)4 - Pro - Gly } n (n = 1 - 6) 地设计接头。以下将该接头的N末端部分的序列记作 LN。

进而，本发明人等已初次清楚，来自大量生产已成为可能的啤酒糖酶的 Kex2 蛋白酶衍生物（分泌型 Kex2 衍生物），以嵌合蛋白质作为底物时，Kex2 蛋白酶识别部位 (Lys / Arg / Pro) - Arg 附近的氨基酸也对其活性产生大的影响。即已清楚，以位于接头的 C 末端的氨基酸序列作为 X1 - X2 - (Lys / Arg) - Arg (式中 X1、X2 是任意的氨基酸)，在 X1 中使用 Arg、Lys 或 His，在 X2 中使用 His 或 Phe 的场合，分泌型 Kex2 衍生物活性最大。以下将该接头的 C 末端部分的序列记作 LC。

以嵌合蛋白质法生产而切出的目的肽，用各种方法进行精制，但在使用该嵌合蛋白质的场合，通过简便的操作，能够有效地除去未反应嵌合蛋白质、保护肽类、来自大肠杆菌的不纯物。即，已清楚，分泌型 Kex2 衍生物反应后，使 pH 移向弱酸性侧，再稀释反应液，降低变性剂浓度，以此使来自大肠杆菌的不纯物的大部分、未反应嵌合蛋白质、保护肽类进

行95%以上的沉淀，在上清液中能保持95%以上的目的肽，通过离心分离或压滤就简便地得到含有目的肽的上清液。

在将该上清液进行pH调制等后，通过直接阳离子交换色谱，吸附目的肽，利用盐浓度的变化或pH的变化进行洗脱，再使洗脱级分通过低压逆相色谱，吸附目的肽，利用有机溶剂的浓度变化进行洗脱且浓缩。有机溶剂浓度降低后，供给逆相HPLC，利用有机溶剂浓度的变化，进行分离分级，得到高纯度的目的肽。

下面，例举目的肽是人副甲状腺激素衍生物hPTH(1-34)说明本发明。

首先，通过合成DNA低聚物的连接制作hPTH(1-84)基因，接着使制成的基因与编码质粒pG210ShCT[G]的hCT[G]基因的领域进行取代，制成 β Ga1-210SPPH84表达用质粒pG210ShProPTH(图3)。制成将从hPTH(1-84)基因的编码N末端的第35号氨基酸(Va1)的密码变成翻译的终止密码，将编码 β Ga1-210S(在从大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的N末端1位至210位的肽中，半胱氨酸残基被丝氨酸残基取代的肽)的基因转变成编码 β Ga1-117S(在从大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的N末端1位至177位的肽中，半胱氨酸残基被丝氨酸残基取代的肽)的基因的pG117SHPPH34(图6-7)。

同样，转变成编码 β Ga1-210的基因，通过插入编码 β Ga1-139S的基因或编码 β Ga1-97S的基因，可以制成pG139SHPPH34或pG97SHPPH34。

这些质粒，通过接头肽Phe-Met-Lys-Ser-Va1-Lys-Lys-Arg分别使编码 β Ga1-97S、 β Ga1-117S和 β Ga1-139S的结构基因与衍生物hPTH(1-34)的结构基因连接，编码该嵌合蛋白质的结构基因处于lac启动子的控制下。另外这些质粒含有四环素耐性基因标志。

尿素溶液的溶解度高， β Ga1-97SPPH34产量少， β Ga1-117SPPH34和 β Ga1-139SPPH34产量高，分泌

型Kex2衍生物反应条件下的溶解性降低，为了从嵌合蛋白质中切出衍生物hPTH(1-34)，需要更多的分泌型Kex2衍生物。因此，为了得到产量高且尿素溶液的溶解度高的嵌合蛋白质，在上述保护肽和接头Met-Ser-Val-Lys-Lys-Arg之间插入由亲水性且在中性附近保持缓冲能力、阻碍嵌合蛋白质的二级结构形成的氨基酸组成的接头LN。

作为LN使用由 $\{(His)_4-Pro-Gly\}_n$ ($n = 1 - 6$) 组成的肽。 $\{(His)_4-Pro-Gly\}_n$ ($n = 1 - 6$) 的导入，以合成编码 $(His)_4-Pro-Gly$ 或者 $\{(His)_4-Pro-Gly\}_2$ 的DNA片段，然后以适当的摩尔比插入编码保护肽的DNA片段的3'末端来进行，可以制作编码包含接头肽的嵌合蛋白质的基因，所述的接头肽含有一个或数个上述氨基酸序列。

再者，DNA片段反转而插入者，以DNA碱基序列分析来确认并除外。用编码这些嵌合蛋白质的质粒转化大肠杆菌M25株，提高嵌合蛋白质的生产率(图8)。其结果表明，在保护肽 $\beta Gal-97S$ 和 $\beta Gal-1139S$ 的场合， $n = 3$ ，在 $\beta Gal-117S$ 的场合， $n = 1 - 6$ ，嵌合蛋白质的产量高。另外，将这些嵌合蛋白质包涵体进行菌体破碎，用离心分离进行洗净、分离，用尿素进行溶化和稀释，供给Kex2-660反应(图9)。

其结果表明，由于 $\{(His)_4-Pro-Gly\}_n$ ($n = 1 - 6$) 的导入，所有嵌合蛋白质对Kex2-660的感受性变高。因此，考虑嵌合蛋白质产量、对Kex2-660的反应性和保护肽的大小，在hPTH(1-34)生产用的嵌合蛋白质中，作为保护肽采用 $\beta Gal-117S$ ，作为接头肽采用由 $(His)_4-Pro-Gly$ 组成的 $\beta Gal-117S_4HPPH34$ 。

由以上结果可知，作为利用分泌型Kex2衍生物切出生理活性肽用的嵌合蛋白质的设计，不仅为了改善大肠杆菌体内的生产率，而且为了改善分泌型Kex2衍生物反应条件下的溶解性，可适当插入 $\{(His)_4-Pro-Gly\}_n$ ($n = 1 - 6$) 这样的肽。

在该过程中，分泌型 Kex2 衍生物按摩尔比需要 1 / 1 0 0 0 的嵌合蛋白质，占制造原材料费的大半。因此，有必要设计利用分泌型 Kex2 衍生物更容易切断的嵌合蛋白质。 β -Gal-117S4HPPH34 的分泌型 Kex2 衍生物识别部位使用人副甲状腺激素前体的前序列 Lys-Ser-Val-Lys-Lys-Arg。

但是，还不清楚该序列在利用分泌型 Kex2 衍生物的切断中是否最合适；像在许多其他蛋白酶中看到的那样，应考虑通过最合适化进一步增加切断效率的可能性。在识别部位的 C 末端侧，因为 hPTH(1-34) 连续，所以氨基酸不能取代，但是如果重新创造识别部位就可以任意选择 N 末端一侧的序列。因此，尝试将是底物的嵌合蛋白质的 P3 部位(X2) 转换成任意的氨基酸。对图 1 中所示 18 种氨基酸序列进行研究的结果已清楚，如果在 X2 中导入 His 或 Phe，从嵌合蛋白质中切出 hPTH(1-34) 的效率就变高。

接着，将副反应少的 His 固定在 X2 上，研究图 1 中所示 P4 部位的 20 种氨基酸序列，结果表明，如果在 X1 中导入 Arg、Lys 或 His，从嵌合蛋白中切出 hPTH(1-34) 的效率就变高。其中切出效率最好者是在 LC 中选择 Arg-His-Lys-Arg。

进而在本研究的过程中已清楚，存在于 β -Gal-117S 的 13 位、14 位的 Arg-Arg 序列的 C 末端侧的钛键被 Kex2 衍生物切断，该结果产生的 β -Gal(1-34)，在利用以后的酸性沉淀进行精制工序中，与 hPTH(1-34) 相同在上清分级中被回收，因此将 14 位的 Arg 取代成 Lys 而控制切断，就抑制 β -Gal(1-34) 的生成。

以上结果表明，在 hPTH(1-34) 生产用嵌合蛋白质中，作为保护肽使用将 14 位的 Arg 取代成 Lys 的 β -Gal-117S (β -Gal-117KS)，作为接头肽使用具有 Pro-His-His-His-His-Pro-Gly-Gly-Arg-Pro-Ser-Arg-His-Lys-Arg 这样的氨基酸序列的肽。

接着本发明人等，以大肠杆菌表达像这样设计的嵌合蛋白质 β -Gal

- 117 K S 4 H R H P H 3 4，作为包涵体，在洗净回收后进行可溶化，研究供给分泌型 K e x 2 衍生物反应时的精制方法。包含来自大肠杆菌的不纯物、未反应嵌合蛋白质和保护肽的肽，利用在从中性至弱酸性时溶解性极端降低，通过使 pH 从适合分泌型 K e x 2 衍生物反应的 pH 7.8 - 8.2 向 6.2 - 6.5 移动，可以进行沉淀。

进一步通过稀释降低变性尿（尿素）浓度，能使大部分不纯物沉淀。通过离心分离或压滤除去沉淀，在上清液中高效率地回收 h P T H (1-34)。将上清液调整到 pH 5.0 后使 h P T H (1-34) 吸附在阳离子交换色谱柱（例如 Poros HS / SPトヨパール）上，以 0.3 mol - 0.4 mol NaCl 进行洗脱。向洗脱液中添加乙酸，使 h P T H (1-34) 吸附在低压逆相色谱上，以 30% 程度的乙腈进行洗脱，除去对浓缩和逆相 HPLC 产生恶劣影响的不纯物。

减压蒸馏除去洗脱液中的乙腈，用 0.22 μm 的膜滤品进行过滤，使 h P T H (1-34) 吸附在逆相 HPLC（例如，Inertsil PrepODS、TSK120T）上，在用乙腈的梯度洗脱中进行分级，集中高纯度的级分，以回收率 40% - 70% 得到纯度 99.5% 的 h P T H (1-34)。由以上结果可知，回收率在到目前为止的报导中是最高，证实了本发明的有用性。

根据实施例具体地说明本发明。但本发明并不限于这些实施例。

下面描述作为本发明的材料使用的质粒、大肠杆菌、在各实施例中共同的基本实验操作。

质粒

质粒 p G 2 1 0 S h C T [G] 是用大肠杆菌乳糖操纵子的启动子能表达嵌合蛋白质的质粒，所述的嵌合蛋白质是在由从 β-半乳糖苷酶的 N 末端 1 位至 210 位的氨基酸组成的肽中，通过谷氨酸残基，将 h C T [G]（在人降钙素的 32 位的氨基酸的 C 末端上附加甘氨酸残基的肽）结合在 76 位、122 位和 154 位的半胱氨酸残基被丝氨酸残基取代的残基（β-G a 1 - 2 1 0 S）上。

将含有编码以限制性内切酶 P v u I 和 E c o R I 消化 p G H α 2

10 (Ser) rop^- 得到的 $\beta\text{Ga1-210S}$ 的一部分的基因的 DNA 片段与含有以限制性内切酶 PvuII 和 EcoRI 消化 pG97S4DhCT[G] 得到的载体部分的 DNA 片段连接而制作 (图 13)。再者, 关于 $\text{pGH}\alpha 210(\text{Ser})\text{rop}^-$ 的制作方法, 在特公平 6-87788 中已公开, 含有质粒 pG97S4DhCT[G] 的大肠杆菌 W3110 株, 命名为大肠杆菌 SBM323, 以保藏号: 微研条寄第 3503 号 (FERM BP-3503)、于 1991 年 8 月 8 日保藏在工业技术院微生物工业技术研究所。

如果该编码目的肽的 DNA 领域与阅读框架相吻合、以 EcoRI-SalI DNA 片段导入质粒 pG210ShCT[G] 中, 就能表达与 $\beta\text{Ga1-210S}$ 有关的嵌合蛋白质。作为合成人副甲状腺激素前体 ($\text{hProPTH}(1-84)$) 基因的克隆和质粒 pGP#19 的制作材料使用 (图 13)。

大肠杆菌

大肠杆菌 JM109 株以感受细胞状态从东洋纺 (株式会社) 购入, 用于质粒的调制。大肠杆菌 M25 株 (W3110 / 0mpT: Sugimula et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 153, 737-759, 1988) 用于嵌合蛋白质的表达。

培养基

在大肠杆菌的培养中使用以下的培养基。

S B 培养基: 0.5% (W/V) 甘油、2.4% (W/V) 酵母提取物、1.2% (W/V) 胰化胨、0.1 mol/L 磷酸氢钾缓冲液 (pH 7.5)。

NU1 合成培养基: 0.4% (W/V) 酵母提取物、0.4% (W/V) K_2HPO_4 、0.4% (W/V) KH_2PO_4 、0.27% (W/V) Na_2HPO_4 、1.2% (W/V) $(\text{NH}_4)_2\text{S}$

O_4 、0.02% (W/V) NH_4Cl 、0.3% (W/V) L-甲硫氨酸、0.2% (W/V) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、40gm/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、40mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、10mg/L $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、10mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.5mg/L H_3BO_3 和 10mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 。

基本的实验操作

在实施例中未具体地表示的情况下，实施操作遵循以下的方法。

以使用磷酸酰胺法的全自动合成机（アプライドバイオシステムズモデル320A）合成DNA引物。以双脱氧法决定DNA碱基序列。

DNA切断使用事先购入的指定的3-10倍量的限制性内切酶进行1小时反应。使用0.5-1 μg 的DNA在20 μl 反应液中进行质粒结构的解析，在DNA的调制中，使用3-10 μg 的DNA在50-100 μl 反应液中进行。反应温度、反应缓冲剂等条件按照购入品中的指定。

在反应液中添加1/5容量的色素液（含有0.25% (W/V) 溴酚蓝的15% (W/V) Ficoll水溶液）调制成琼脂糖凝胶电泳试样。在琼脂糖凝胶电泳用缓冲剂中使用TAE缓冲剂(40mmol Tris/乙酸、2mmol EDTA)。在质粒的结构解析中，使用Mu坪井-2（コスモバイオ（株式会社）），进行100伏、1小时的电泳，在为了DNA的调制中，使用水平凝胶(20cm×15cm×0.7cm)，进行150伏、4小时或者35伏、13小时的电泳。凝胶用溴化3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶翁溶液(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)染色20分钟后，照射紫外线，检测到DNA光谱。琼脂糖凝胶浓度对照要分级的DNA片段的大小使用1.0%、2.0% (W/V)。

将凝胶放入充满0.1×TAE缓冲剂的透析管内，施加电压使琼脂糖凝胶中的DNA溶出，从凝胶中提取出。将DNA溶液进行苯酚处理、

氯仿处理后，进行乙醇沉淀，将DNA精制。

连接反应，向含有0.05-1μg的DNA片段的反应液(6.7m mol Tris/HCl(pH 7.5)、5mmol MgCl₂、5mmol DTT、1mmol ATP)30μl中添加10单位的T4 DNA连接酶，在16℃进行12-18小时反应，或者使用TAKARA连接试剂盒(宝酒造(株式会社))进行。

大肠杆菌JM109株的转化按照购入前的指示进行，大肠杆菌25株的转化法按照氯化钙法进行，按照耐药性(四环素)选择转化株。

添加同量的SDS试样缓冲剂(6.3mmol Tris/HCl(pH 6.8)、10% (W/V)甘油、10% (W/V) SDS、1.0mg/ml溴酚蓝，煮沸3分钟调制成SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)试样。使用16% (W/V) SDSPAGE mini (TEFCO)凝胶，每1枚以20mA进行70分钟，凝胶用考马斯亮蓝G染色。

hPTH(1-34)的定量，首先以试样缓冲剂(1mol乙酸/2mol尿素)将含有hPTH(1-34)的溶液从10倍稀释至20倍后，得到离心上清液，接着，将其供给连接YMC-ODS-A302(d 4.6 mm × 150 mm)柱((株式会社)山村化学研究所)的HPLC(岛津制作所(株式会社)LC10A)，在A液(0.1% (V/V)三氟乙酸(TFA)/10% (V/V)乙腈)、B液(0.094% (V/V) TFA/50% (V/V)乙腈)，B 40% → 80% / 20 min梯度体系进行展开，将以214 nm的吸光度测定检测出的hPTH(1-34)的峰面积与既知浓度的标准hPTH(1-34)的峰面积进行比较。

其他，除另外表示的以外，基本的基因操作按照在Molecular Cloning (Maniatis等编，Cold Spring Harbor laboratory, New York (1982))中记载的方法进行。

实施例1 h ProPTH (1-84) 基因的制作

h ProPTH (1-84) 基因，如图1所示，分成U1-U7（序列号1-7）和L1-L7（序列号8-14）的14个片段，进行合成。

像以下那样连接各片段制成h ProPTH (1-84) 基因（图2）。

首先，使DNA片段U1（序列号1）和L7（序列号14（各约1 μ g）与16单位的T4多核苷酸激酶在含0.5nmol(1molBq以上)的[γ-32P]dATP的磷酸化反应液15μl中(50mmol Tris/HCl(pH7.6)、10mmol MgCl₂、5mmol DTT)、在37℃反应15分钟。再向其中添加含5mmol ATP的磷酸化反应液5μl，在37℃再反应45分钟。关于U2（序列号2）和L6（序列号13）、U3（序列号3）和L5（序列号12）、U4（序列号4）和L4（序列号11）、U5（序列号5）和L3（序列号10）、U6（序列号6）和L2（序列号9）、U7（序列号7）和L1（序列号8）也同样地进行。

将上述7个反应液集中到一起，进行乙醇沉淀而回收DNA。将其溶解到80μl的100mmol Tris/HCl(pH7.6)、6.5mmol MgCl₂、300mmol NaCl中。将其中的40μl在95℃放置5分钟后，经30分钟使温度降到43℃。冰冷却后添加40μl的连接液B（宝酒造（株式会社）），在26℃放置15分钟。

将该试样供给5%聚丙烯酰胺电泳。电泳后用自动X射线照像术检测已连接的DNA片段。从凝胶中提取相应约280bp的DNA片段后，按照常规方法进行精制。

实施例2 βGal-139S(FM)PPH84表达质粒pGP#19的制作

在含有合成h ProPTH (1-84) 基因的约280bp的DNA片段中，在5'末端存在限制性内切酶Eco RI部位，在3'末端存在限制性内切酶Sal I部位。在pG210ShCT [G] 的Eco RI/Sal I DNA片

段进行 h ProPTH (1-84) 基因的克隆。

用限制性内切酶 Eco RI 和 Sal I 切断 pG210ShCT [G] 后，调制成含载体部分的约 3.5 Kb DNA 片段。将其与由实施例 1 得到的约 280 bp 组成的 h ProPTH (1-84) 基因的 DNA 片段连接，得到质粒 pG210ShProPTH (图 3)。用 pG210ShProPTH 使大肠杆菌 JM109 株进行转化，得到 JM109 [pG210ShProPTH]。

再在 pG210ShProPTH 的限制性内切酶 Xho I / Eco RI 部位导入接头 KM091 (序列号 15) 和 KM092 (序列号 16)，制成质粒 pG210S (S/X) (图 3)。再者，该接头在两端保持限制性内切酶 Xho I 和 Eco RI 部位，在其中间保持 Sac I 部位。

pG210S (S/X) 用限制性内切酶 Sac I 和 Xho I 消化后，使用 Kilo - 测序用 Deletion 试剂盒 (宝酒造 (株式会社))，使编码 β Gal-210 的 DNA 领域随时间变化且特异地进行缺失。以 Klenow 片段进行末端修复后，进行细胞连接，得到编码嵌合蛋白质 β Gal-1-139S (FM) PPH34 的质粒 pGP#19 (图 4)，所述的嵌合蛋白质是通过 Phe-Met 将 β Gal-1-139S 和 hProPTH (1-84) 连接的嵌合蛋白质。将导入 pG#19 的大肠杆菌 JM109 株称作 JM109 [pGP#19]。

实施例 3 β Gal-1-117SmPPH34 表达质粒 pG117SmPPH34 的制作

在本实施例中，虽然例举出 β Gal-1-117SmPPH34 表达质粒 pG117SmPPH34 的制作，但通过使用 β Gal-97S 或 β Gal-1-139S 转变成 β Gal-1-117S，能够制作 β Gal-97SmPPH34 表达质粒 pG139SmPPH34。

1) pG#19PPH34 的制作

p G # 1 9 P P H 3 4 的制作过程是，在模板上以 S 0 1 (序列号 17) 和 S 0 2 (序列号 18) 作为引物，利用 PCR 法将 h P T H (1-84) 的 35 位的缬氨酸残基的密码 G T T 转换成翻译停止密码 T A A 的 DNA 片段扩增后，按照常规方法将限制性内切酶 A a t I I - S a l I DNA 片段离析精制，与对应 p G P # 1 9 的对应部分交换而制成 p G P # 1 9 P P H 3 4 (图 5)。

2) p G 1 1 7 S P P H 3 4 的制作

在模板上以 S 0 3 (序列号 19) 和 S 0 5 (序列号 20) 作为引物、利用 PCR 法将 p G 2 1 0 (S / X) 扩增后，以限制性内切酶 P v u I 和 S m a I 消化形成 DNA 片段，在模板上以 S 0 7 (序列号 21) 和 S 0 2 作为引物、利用 PCR 法将 p G P # 1 9 P P H 3 4 扩增后，以限制性内切酶 S a l I 和 S m a I 消化形成 DNA 片段，用 T 4 连接酶将上述两个 DNA 片段和包含 p G P # 1 9 P P H 3 4 的复制开始起点的限制性内切酶 P v u I - S a l I DNA 片段连接，就制成 p G 1 1 7 S P P H 3 4 (图 6-7)。

3) p G 1 1 7 S m H P P H 3 4 ($m = 4$ 或 8) 的制作

在 p G 1 1 7 S P P H 3 4 的限制性内切酶 S m a I 部位插入编码 (H i s) 4 - P r o - G l y 的接头 S 0 8 (序列号 22) 和 S 0 9 (序列号 23)、编码 { (H i s) 4 - P r o - G l y } 2 的接头 S 1 0 (序列号 24) 和 S 1 1 (序列号 25) 制成 p G 1 1 7 S m H P P H 3 4 ($m = 4$ 或 8)。通过变化接头的长度可以制作 $m = 12$ 、 16 或 24 的质粒 (图 6-7)。

再有，在 p G 1 1 7 S P P H 3 4 的限制性内切酶 S m a I 部位插入编码 (L y s) 4 - P r o - G l y 的接头 S 1 2 (序列号 26) 和 S 1 3 (序列号 27)，制成 p G 1 1 7 S 4 K P H 3 4。同样进行能够制成 p G 9 7 S 4 K P H 3 4、p G 1 3 9 S 4 K P P H 3 4。

另外，所插入的接头数目和方向，在调制质粒后，决定 DNA 碱基序

列后来确认，在本实施例中将制成的嵌合蛋白质示于表1中。

表 1

	β Gal-97SmHPPH34	β Gal-117SmHPPH34	β Gal-139SmHPPH34
-	○	○	○
4H	○	○	
8H	○	○	○
12H	○	○	○
16H		○	
24H		○	
4K	○	○	○

表中，H表示组氨酸残基，K表示赖氨酸残基、数字各表示氨基酸数目。

实施例4 h P T H (1-34) 嵌合蛋白质的生产

使用SDS-PAGE调查了表1所示的嵌合蛋白质的生产率。将16个含有编码表1所示嵌合蛋白质的基因的质粒分别导入大肠杆菌JM109株中，在2mL的SB培养基上于37℃在试管内振动培养16小时后，用生理盐水稀释，使培养液浓度(OD660)达到1.0。向100μl该悬浮液中添加同量的SDS试样缓冲剂，煮沸3分钟，使用其10μl上清液进行SDS-PAGE，比较每个菌体的嵌合蛋白质的产量。

结果示于图8中。结果表明，通过 β -半乳糖苷酶衍生物和组氨酸残基数的组合变化表达量， β Gal-97S，在{(His)₄-Pro-Gly}_n中，n=2、3， β Gal-117S，n=1、2、3、4、6， β Gal-139S，n=2、3获得高产量。尤其，在 β Gal-117S的衍生物中，由于导入{(His)₄-Pro-Gly}_n(n=1-6)，表达量显著增加，它们的产量更多利用赖氨酸残基单独改变电荷。

实施例5 从嵌合蛋白质中切出hPTH(1-34)

关于高产量的嵌合蛋白质(β Gal-97SmHPPH₃₄(n=12)、 β Gal-117SmHPPH₃₄(m=0、4、8、12、16、24)、 β Gal-139SmHPPH₃₄(m=0、12)；控制m=0)，为了调查作为Kex2-660的底物的适用性，回收嵌合蛋白质包涵体，以8mol尿素溶解后，进行稀释以形成反应液组成(2.0mmol Tris/HCl(pH8.2)、1.00mmol NaCl、3.0mol尿素、2.0mmol CaCl₂、8ml/ml嵌合蛋白质)，添加Kex2-660，使终浓度成为20kU/ml，进行hPTH(1-34)的切出。在本条件下，在1小时控制的 β Gal-117SPPH₃₄90%以上被切断。

各衍生物的K_{cat}的比示于图9中。以“基本的实验操作”所示的方法进行hPTH(1-34)的定量。该结果表明，在所有的实施的例子中，由于导入{(His)₄-Pro-Gly}_nKex2-660的反应性也得到改善。

尤其， β Gal-117S4HPPH₃₄插入1个(His)₄-Pro-Gly接头，嵌合蛋白质的产量和Kex2-660的反应性被改善，而且还知道， β Gal-139SPPH₃₄的15g/L以上与8g/L相比，Kex2反应条件下的溶解度也得到改善。

实施例6 hPTH(1-34)的大量生产

为了大量地得到高表达而且也适合作为Kex2-660的底物的嵌合蛋白质 β Gal-117S4HPPH₃₄，以具有编码本嵌合蛋白质的基因的质粒pG117S4HPPH₃₄使大肠杆菌M25株(W3110/ompT)进行转化，得到M25[pG117S4HPPH₃₄]株。使用由2%(W/V)酵母提取物、1%(W/V)胰化胨、1.2%(W/V)K₂HPO₄、0.3%(W/V)KH₂PO₄、0.5%(W/V)甘油组成的培养基，在20L培养槽中在37°C进行培养。

菌体浓度，在OD₆₆₀=1.0时，添加IPTG（异丙基β硫代半乳糖苷），使最浓浓度达到1mmol，继续培养至菌体浓度OD₆₆₀=12。集中菌体后，悬浮在TE(10mmol Tris/HCl、1mmol EDTA(pH8.0)中，用高压匀浆器(Manton-Gaulin)破碎菌体后，离心分离所得到的匀浆产物，得到含有嵌合蛋白质的沉淀，接着用TE和去离子水洗净该沉淀。这样，从20L的培养物中得到含有嵌合蛋白质的包涵体100g。向250ml包涵体悬浮液(160g/L)中添加1mol Tris/HCl(pH8.2)100ml、5mol NaCl 50ml、去离子水500ml、尿素900g，在30℃的恒温槽中进行30分钟搅拌溶解，用温去离子水稀释，在300℃形成5L。

一面搅拌，一面向其中平稳地添加250mmol CaCl₂溶液500ml，再以Kex2-660形成20kU/ml添加Kex2-660。2小时后，(切断效率90%以上)用乙酸调节至pH6.4，再用去离子冰稀释至2倍，使未反应嵌合蛋白质和保护肽凝聚而沉淀。通过离心分离得到含有hPTH(1-34)的上清液，用乙酸调节至pH5.0，通过以10mmol乙酸钠缓冲液平衡的阳离子交换树脂(SPDYPA-RE)柱，吸附hPTH(1-34)，用0.4mol NaCl使hPTH(1-34)洗脱出。

向其中使最终形成3%(V/V)那样添加乙酸，通过以3%(V/V)乙酸平衡化的低压逆相柱(Soden ODS-W)，吸附hPTH(1-34)，用含乙酸的30%(V/V)乙腈溶液洗脱出hPTH(1-34)。在减压下除去乙腈，用0.22μm的膜滤器进行过滤，逆相HPLC分离柱(TSKgel ODS-120TΦ55×600)进行精制。以乙腈的直线浓度梯度(A: 5%(V/V)乙酸/10%(V/V)乙腈；B: 5%(V/V)乙酸/40%(V/V)乙腈；%B=20%→80%/60分、流速40ml/min)进行洗脱。各过程的hPTH(1-34)的回收率示于表2中。

表 2

过程名称	P T H量 (g)	回收率 (%)
K e x 2 - 6 6 0 反应	7. 0	1 0 0
酸沉淀上清液	6. 7	9 5
阳离子交换柱	6. 0	8 5
低压逆相柱	5. 8	8 2
H P L C	4. 0	7

实施例 7 嵌合蛋白质的K e x 2 - 6 6 0 识别部位P 3 的氨基酸取代

为了将P 3 部位的氨基酸 (L y s) 转换成其他的氨基酸，合成已转换对应P 3 部位的密码的多核苷酸S 1 4 - S 1 8 (序列号2 8 - 3 2)，以它们和S 0 2 (序列号1 8) 作为引物，以p G 1 1 7 S 4 H P P H 3 4 作为模板，用P C R法合成DNA片段。用乙醇沉淀法精制该DNA片段，以S t u I 和S a l I 切断后，进行2. 0 % (W / V) 琼脂糖电泳，将作为目的的0. 4 K b.p的S t u I - S a l I 片段精制。

接着，将该DNA片段和将以S t u I 和S a l I 消化、进行同样的精制的p G 1 7 S 4 H P P H 3 4 的 β -半乳糖苷酶部分编码的DNA片段供给连接反应。反应后，使大肠杆菌J M 1 0 9 株进行转化。每个组合选择1 0 个四环素耐性克隆，利用DNA序列决定分析来自这些克隆的质粒，得到作为目的表达的载体。

即得到下述的嵌合蛋白质 β G a 1 - 1 1 7 S 4 H V X P H 3 4 的表达p G 1 1 7 S 4 H V X P H 3 4，所述的蛋白质保持p G 1 1 7 S 4 H P P H 3 4 的编码嵌合蛋白质的K e x 2 - 6 6 0 识别部位S e r - V a l - L y s - L y s - A r g 被S e r - V a l - X - L y s - A r g (X = G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、S e r、T h r、A s p、G l u、A s n、G l n、L y s、A r g、P h e、T y r、T r p、H i s、P r o) 取代的氨基酸序列。

为了调查各嵌合蛋白质和Kex2-660反应性，在50ml的S B培养基中培养各克隆，在菌体浓度OD₆₆₀=1.0时，用IPTG诱导表达后，再继续培养4小时，然后收集菌体，进行TE缓冲液洗净、悬浮、破碎、离心分离，得到包涵体。再用1%（W/V）Triton X100、10mmol EDTA和TE洗净，得到精制的包涵体。

在该包涵体中包含的肽成分的90%以上是作为目的的嵌合蛋白质。向各嵌合蛋白质的包涵体悬浮液中添加1mol Tris/HCl(pH8.2) 20μl、5mol NaCl 20μl、10mol尿素300μl，溶解包涵体用650μl去离子水稀释后，在30°C的恒温槽中保温10分钟，向其中添加250mmol CaCl₂溶液10μl，再形成20kU/ml那样添加Kex2-660。

在此条件下，在1小时对照的βGal-117SPPH34，90%以上被切断。hPTH(1-34)的生成，以使用上述的ODS柱的HPLC进行定量。各衍生物的Kex2-660反应性，以与pG117S4HPPH34的Kcat之比表示（图10）。在X=Phe、His时，由Kex2-660引起的hPTH(1-34)的切出效率良好，在X=Pro时，几乎没有看到由Kex2-660引起的切出。

实施例8 嵌合蛋白量的Kex2-660识别部位P4的氨基酸取代

从实施例7的结果以及因为切断时的副产物少，所以选择在P3部位保持组氨酸残基的嵌合蛋白质βGal-117S4HVHPH34作为用于生产hPTH(1-34)的嵌合蛋白质，试验由P4部位的氨基酸取代而引起的Kex2-660反应性的提高。合成多核苷酸S19-S24（序列号33-38），以它们和S02作为引物，以pG117S4HVHPH34作为模板，按照PCR法合成导入变异的DNA质粒。

按照实施例7所示方法，得到下述的嵌合蛋白质βGal-117S4HXHPH34的表达载体pG117S4HXHPH34，所述的嵌合蛋白质保持嵌合蛋白质的Kex2-660识别部位Ser-Val-

H i s - L y s - A r g 被 S e r - X - H i s - L y s - A r g (X = G l y 、 A l a 、 L e u 、 I l e 、 S e r 、 T h r 、 A s p 、 G l u 、 A s n 、 G l n 、 L y s 、 A r g 、 C y s 、 M e t 、 P h e 、 T y r 、 T r p 、 H i s 、 P r o 、 V a l) 取代的结构。

以该嵌合蛋白质作为底物，以和实施例 6 相同的条件，判断对 K e x 2 - 6 6 0 的感受性。在 X = L y s 、 A r g 时，由 K e x 2 - 6 6 0 引起为 h P T H (1 - 3 4) 的切出效率变好，在 X 是酸性氨基酸 (A s p 、 G l u) 时，几乎看不到由 K e x 2 - 6 6 0 引起的 h P T H (1 - 3 4) 的切断 (图 1 1)。由此初次清楚， K e x 2 - 6 6 0 蛋白酶不仅在 P 1 部位要求精氨酸残基，在 P 2 部位要求强碱性氨基酸或脯氨酸残基，而且在 P 3 部位希望是组氨酸残基或苯丙氨酸残基，在 P 4 部位是强碱性氨基酸，以及如果在 P 3 部位有丙氨酸残基，或者在 P 4 部位有酸性氨基酸，就极端地降低嵌合蛋白质的切断活性。

实施例 9 保护肽的 K e x 2 - 6 6 0 切断部位的除去

随时间变化对实施例 7 和 8 中的 K e x 2 - 6 6 0 切断反应追踪的结果表明，保护肽 β G a l - 1 1 7 S 的 1 3 、 1 4 位的 A r g - A r g 序列的 C 末端的肽键已切断。预料在利用酸性沉淀进行精制时混入由此产生的 β G a l (1 - 1 4)。因此，将 1 4 位的 A r g 取代成 L y s ，抑制由 K e x 2 - 6 6 0 引起的切断，抑制 β G a l (1 - 1 4) 的生成。

像以下那样制作编码 1 4 位的 A r g 被 L y s 取代的嵌合蛋白质 (β G a l - 1 1 7 K S 4 H R H P H 3 4) 的质粒 p G K S P H 3 4 (图 1 2)。首先，以低聚核苷酸 S 2 5 (序列号 3 9) 和 S 2 6 (序列号 4 0) 作为引物，以 p G 1 1 7 S 4 H R H P H 3 4 作为模板，用 P C R 法合成导入变异的 D N A 片段、 A s e I - R K 。同样以低聚核苷酸 S 2 7 (序列号 4 1) 和 S 2 8 (序列号 4 2) 作为引物，合成 D N A 片段、 R K - B g I I I 。

将各 D N A 片段精制，分别各混合约 1 n g，在引物不存下进行 4 次 P C R，合成导入变异的 A s e I - B g I I I 质粒。向其中再添加

低聚核苷酸S25和S28，继续PCR，将同一质粒扩增。用乙醇沉淀法精制该质粒，以Ase I和Bgl II切断后，进行2.0%（W/V）琼脂糖电泳，调制成作为目的的0.35Kbp的片段。将pG117S4HRHPH34的Ase I/Sph I（1.8Kbp）片段和Sph I/Bgl II（1.4kbp）片段进行1.0%（W/V）琼脂糖电泳，并进行精制。

在上述3个片段进行连接反应后，使大肠杆菌JM109进行转化，得到耐四环素菌株，用碱性法调制质粒后，解析变异导入部分的DNA碱基序列，选择保持下述质粒pGKSPH34的目的克隆，所述质粒包含编码保护肽14位的Arg的DNA序列CGG被AAG取代的基因。以实施例5所示的方法，得到嵌合蛋白质的包涵体，Kex2-660反应的结果表明，通过上述取代基本能完全抑制保护肽的切断，能减轻精制工序的负担。

实施例10 嵌合蛋白质 β Ga1-117KS4HRHPH34的大量调制和hPTH(1-34)的生产

以试管规模被认为最适合作为Kex2-660的底物的嵌合蛋白质Ga1-117KS4HRHPH34在大量培养条件下的生产率和利用Kex2-660蛋白酶的切出，以及进行hPTH(1-34)的精制。

用pGKSPH34进行大肠杆菌M25株的转化，得到耐四环素菌株；制成生产菌株M25] [pGKSPH34]。将M25 [pGKSPH34]株在包含2%（W/V）葡萄糖的NU1培养基中进行大量培养。

消耗葡萄糖后，作为碳源供给甘油，边调整到pH7.0，边培养24小时。最终达到的菌体浓度是150-200OD。该嵌合蛋白质即使在大量培养条件下也显示稳定的生产率，尽管大量表达，也未出现显著地妨碍宿主大肠杆菌的生育。包涵体产量是约5g/L培养基。用TE和去离子水洗净菌体破碎后的不溶性分级后，得到精制的包涵体。

用尿素进行可溶化后进行稀释，以20mmol Tris/HCl

(pH 8.2)、50 mmol NaCl、2.5 mmol CaCl₂、2.7 mol 尿素、8.0 mg/ml 嵌合蛋白质作为反应液组成，在30°C反应温度，使成为5kU/ml地添加Kex 2-660，进行从嵌合蛋白质中切出hPTH(1-34)，对hPTH(1-34)的生成进行定量。在30分钟，切断率达到90%以上，与βGal-117S4H₃4相比，Kex 2-660量减少到1/4。反应终了后，hPTH(1-34)进行与实施例5相同地精制。精制工序的回收率与实施例5大体相同。

实施例11 βGal-117S4H₃4HGP生产质粒、pG117S4HGP的制作

生产包含胰高血糖素样的肽I(hGLP-I(7-37))的嵌合蛋白质(βGal-117S4HGP)的质粒、pG117S4HGP按以下序列制作。首先，合成如图4所示的4种DNA(GLP-1(序列号43)、GLP-2(序列号44)、GLP-3(序列号45)、GLP-4(序列号46)，使用多核苷酸磷酸化酶将它们5'末端磷酸化后，将它们混合，进行退火，调制成HGLP-1(7-37)基因(DNA(I))。另一方面，图14(b)所示的2种合成DNA(117S4HSph I引物(序列号47)、117S4HBgl II引物(序列号48)作为PCR引物使用，以pGKSPH34作为模板进行PCR。得到的PCR产物以Bgl II和Sph I消化，调制成为保持Bgl II和Sph I的粘附末端的DNA片段(DNA(I))。

接着，以Bgl II和Sal I消化pGKSPH34后，进行1%琼脂糖电泳，用凝胶回收大的一方的DNA片段(DNA(III))。用T4 DNA连接酶连接如此得到的DNA(I)、DNA(II)和DNA(III)，制作成pG117S4HGP(图15)。

实施例12 嵌合蛋白质βGal-117S4HGP的生产

在32℃、在含有1.5%葡萄糖、4g/L K₂HPO₄、4g/L KH₂PO₄、2.7g/L Na₂HPO₄、0.2g/L NH₄Cl、1.2g/L (NH₄)₂SO₄、4g/L 酵母提取物、2g/L L-甲硫氨酸、2g/L MgSO₄·7H₂O、40mg/L CaCl₂·2H₂O、40mg/L FeSO₄·7H₂O、10mg/L MnSO₄·nH₂O、10mg/L AlCl₃·H₂O、4mg/L CoCl₂·6H₂O、2mg/L ZnSO₄·7H₂O、2mg/L NaMoO₄·2H₂O、1mg/L CuCl₂·2H₂O、0.5mg/L H₃BO₄、10mg/L 四环素的培养基中、以pH 7.0 培养具有已制成的 pG117S4HGP 的大肠杆菌 W3110M25 株，葡萄糖枯竭后，以甘油作为碳源，在37℃再培养8小时，使在菌体内产生 βGal-117S4HGP 的包涵体。

培养终了后，使用マントンゴリ匀浆器（マントンゴリ公司制，型号 15M-8tA）、在600KG/cm² 的条例上处理培养液，通过离心分离（CEPA 离心分离机）回收沉淀分级。将得到的沉淀悬浮在与培养液等量的缓冲液（10mmol Tris-HCl (pH 8.0)、1mmol EDTA）中后，再次以离心分离回收沉淀；悬浮在与培养液等量的去离子水中。然后，再进行离心分离，回收沉淀后，悬浮于与沉淀等量的去离子水中，用于以后的操作。

实施例 13 从嵌合蛋白质中切出 hGLP-1 (7-37)

回收以实施例 12 得到的嵌合蛋白质包涵体，以 8 mol 尿素溶解后进行稀释，以形成反应 组成（20mmol Tris-HCl (pH 8.2)、100mmol NaCl、3.0mol 尿素、2.0mmol CaCl₂、8mg/ml 嵌合蛋白质），以 10000U/ml 添加 Kex2-660，进行 hGLP-1 (7-37) 的切出。在此条件下，在 1 小时控制的 βGal-117S4HGP，90% 以上被切断。

实施例14 hGLP-1(7-37)的均分(图16、表3)

为了大量得到高表达而且也适合作为Kex2-660的底物的嵌合蛋白质 β Gal-117S4HGP，用编码该嵌合蛋白质的质粒pG117S4HGP进行大肠杆菌M25(W3110/ompT)的转化，在20L培养槽中进行培养。培养基由酵母提取物20g/L、细菌胰化胨10g/L、 K_2HPO_4 12g/L、 KH_2PO_4 3g/L、甘油5g/L组成，在菌体浓度是OD660=1.0，添加IPTG(异丙基 β 硫代半乳糖苷，使最终浓度成为1mmol)。使用消泡剂(テイスフオムCC-222，(株式会社)日本油脂)。

在37℃继续培养至菌体浓度OD60=12。集中菌体后，悬浮在TE(10mmol Tris/HCl、1mmol EDTA pH 8.0)中，用高压匀浆器(Manton-Gaulin)破碎菌体，离心分离得到的匀浆产物，得到含有嵌合蛋白质的沉淀，接着用TE和去离子水洗净该沉淀。这样从20L的培养物中得到约100g含有嵌合蛋白质的包涵体。向250ml包涵体悬浮液(160g/L)中添加1mol Tris/HCl(pH 8.2)100ml、5mol NaCl溶液50ml、去离子水500ml、尿素900g，在30℃的恒温槽中进行30分钟搅拌溶解，用温去离子水稀释，在30℃形成5L。边搅拌边缓慢地向其中添加250mmol $CaCl_2$ 溶液50ml，再形成20000单位/ml(约4.0mg/L)地添加Kex2-660。

2小时后，(切断率90%以上)用乙酸调整至pH6.4，再用去离子水稀释至2倍，使未反应嵌合蛋白质和保护肽凝聚沉淀。用离心分离得到含hGLP-1(7-37)的上清液，用乙酸调整至pH5.0，通过用2mol尿素·10mmol乙酸钠缓冲液(pH5.0)平衡化的阳离子交换树脂(SPトヨバル)柱，吸附hGLP-1(7-37)，用2mol尿素·10mmol乙酸钠缓冲液(pH6.2)洗净后，以0mol至300mmol的氯化钠浓度梯度洗脱hGLP-1(7-37)。

7)。预先在级分管中放入乙酸，最终形成3%，抑制hGLP-1(7-37)的凝集。集中含有hGLP-7(7-37)的级分，通过以5%乙酸平衡化的低压逆相柱(Soken ODS-W)，吸附hGLP-1(7-37)，用含5%乙酸的50%乙腈溶液洗脱hGLP-1(7-37)。在减压下除去乙腈，用0.22μm的磨滤器过滤后，进行冻结干燥。

以下详述hGLP-1(7-37)的定量。以试样缓冲剂(1mol/L乙酸/2mol尿素)将含有hGLP-1(7-37)的溶液从10倍稀释至20倍，得到离心上清液。在HPLC(岛津LC10A)中接续YMC-C8-A302(4.6mm I.D. × 150mm)柱，用A液(0.1%TFA/10%乙腈)、B液(0.094%TFA/60%乙腈)、B40%→80%/20min梯度的体系将该上清液的10μl至20μl展开，从以220nm的吸光度测定检测的hGLP-1(7-37)与已知浓度的标准hGLP-1(7-37)的峰面积比进行定量。回收率示于表3中。

表3
hGLP-1(7-37)回收率

工序名称	容积/[l]	hGLP-1/[g]	回收率/[%]
Kex2-660	4.0	4.8	100
酸沉淀上清液	7.8	3.3	68
阳离子交换柱	0.5	2.8	60
低压逆相柱		2.0	40

序列表

序列号： 1

序列长： 40

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

A A T T C A T G A A A T C T G T T A A A A A G C G T T C T G
T T T C T G A A A T

序列号： 2

序列长： 41

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

T C A G C T G A T G C A T A A C C T G G G C A A A C A C C T
G A A T A G C A T G G

序列号： 3

序列长： 41

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

A A C G C G T C G A G T G G C T G C G T A A G A A A C T G C
A G G A C G T C C A C

序列号： 4

序列长: 41

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序顺种类: 合成DNA

序列

A A C T T C G T T G C G C T G G G T G C A C C G C T G G C T
C C A C G T G A T G C

序列号: 5

序列长: 39

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序顺种类: 合成DNA

序列

A G G A T C C C A A C G T C C G C G T A A G A A A G A A G A
T A A C G T A C T

序列号: 6

序列长: 40

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序顺种类: 合成DNA

序列

G G T T G A A T C T C A T G A G A A A T C C C T G G G C G A
A G C T G A C A A A

序列号: 7

序列长: 40

序列类型: 核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

G C C G A T G T T A A C G T G C T G A C C A A A G C G A A A
A G C C A G T A A G

序列号： 8

序列长： 33

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

T C G A C T T A C T G G C T T T T C G C T T T G G T C A G C
A C G

序列号： 9

序列长： 40

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

T T A A C A T C G G C T T T G T C A G C T T C G C C C A G G
G A T T T C T C A T

序列号： 10

序列长： 40

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

G A G A T T C A A C C A G T A C G T T A T C T T C T T T C T
T A C G C G G A C G

序列号： 1 1

序列长： 41

序列类型：核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类：合成DNA

序列

T T G G G A T C C T G C A T C A C G T G G A G C C A G C G G
T G C A C C C A G C G

序列号： 1 2

序列长： 41

序列类型：核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类：合成DNA

序列

C A A C G A A G T T G T G G A C G T C C T G C A G T T T C T
T A C G C A G C C A C

序列号： 1 3

序列长： 41

序列类型：核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类：合成DNA

序列

T C G A C G C G T T C C A T G C T A T T C A G G T G T T T G
C C C A G G T T A T G

序列号： 1 4

序列长： 4 6

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成D N A

序列

C A T C A G C T G A A T T T G A G A A A C A G A A C G C T T
T T T A A C A G A T T T C A T G

序列号： 1 5

序列长： 2 4

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成D N A

序列

T C G A G G T C G A C G G T A C C G A G C T C G

序列号： 1 6

序列长： 2 4

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成D N A

序列

A A T T C G A G C T C G G T A C C G T C G A C C

序列号： 1 7

序列长： 4 5

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

A A A C T G C A G G A C G T C C A C A A C T T C T A A G C G
C T G G G T G C A C C G C G T

序列号：18

序列长：24

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

C A T T A A A G C T T T G C G A T G A T A A G C

序列号：19

序列长：26

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

C G C A C C G A T C G C C C T T C C C A A C A G T T

序列号：20

序列长：35

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

T T T C C C G G G C C T C C G T G G G A A C A A A C G G C G
G A T T G

序列号： 2 1

序列长： 4 2

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

T T T C C C G G G A G G C C T T C T G T T A A A A A G C G G
T C T G T T T C T G A A

序列号： 2 2

序列长： 1 8

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

C A C C A T C A T C A C C C T G G A

序列号： 2 3

序列长： 1 8

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

T C C A G G G T G A T G A T G G T G

序列号： 2 4

序列长: 36

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序顺种类: 合成DNA

序列

C A C C A C C A T C A T C C T G G A C A C C A T C A T C A C
C C T G G A

序列号: 25

序列长: 36

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序顺种类: 合成DNA

序列

T C C A G G G T G A T G A T G G T G T C C A G G A T G A T G
G T G G T G

序列号: 26

序列长: 18

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学: 直链状

序顺种类: 合成DNA

序列

A A G A A G A A G A A G C C T G G A

序列号: 27

序列长: 18

序列类型: 核酸

链数: 单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

T C C G G A C T T C T T C T T C T T

序列号：28

序列长：36

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

G G G A G G G C C T T C T G T T N C A A A G C T T T C T G T T

T C T G A A

序列号：29

序列长：36

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

G G G A G G G C C T T C T G T T N A T A A G C T T T C T G T T

T C T G A A

序列号：30

序列长：36

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

GGGAGGCC TT CTGTTNTTAA GCTTTCTGTT
TCTGAA

序列号： 3 1

序列长： 3 6

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

GGGAGGCC TT CTGTTBGGAA GCTTTCTGTT
TCTGAA

序列号： 3 2

序列长： 3 6

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

GGGAGGCC TT CTGTTSAAAA GCTTTCTGTT
TCTGAA

序列号： 3 3

序列长： 3 3

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

GGGAGGCC TT CTADTCATAA GCTTTCTGTT
TCT

序列号： 3 4
序列长： 3 3
序列类型： 核酸
链数： 单链
拓扑学： 直链状
序顺种类： 合成DNA
序列
G G G A G G C C T T C T A H G C A T A A G C T T T C T G T T
T C T

序列号： 3 5
序列长： 3 3
序列类型： 核酸
链数： 单链
拓扑学： 直链状
序顺种类： 合成DNA
序列
G G G A G G C C T T C T G H G C A T A A G C T T T C T G T T
T C T

序列号： 3 6
序列长： 3 3
序列类型： 核酸
链数： 单链
拓扑学： 直链状
序顺种类： 合成DNA
序列
G G G A G G C C T T C T T K K C A T A A G C T T T C T G T T
T C T

序列号： 3 7
序列长： 3 4

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

GGGAGGCC TT CT CVACATAA GCTTTCTGTT
TCTG

序列号：38

序列长：34

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

GGGAGGCC TT CT BATCATAA GCTTTCTGTT
TCTG

序列号：39

序列长：27

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

AATTAAATGTG AGTTAGCTCA CCATTAG

序列号：40

序列长：24

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

A T C C C A G T C T T T A G C T T G T A A A A C

序列号： 4 1

序列长： 24

序列类型：核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

G T T T T A C A A C G T A A A G A C T G G G A T

序列号： 4 2

序列长： 31

序列类型：核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

T T T A G A T C T G A C T C C A G C A A G C T G T C C G G C

A

序列号： 4 3

序列长： 57

序列类型：核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

C G G A A G G T A C C T T T A C C A G C G A T G T G A G C T
C G T A T C T G G A A G G T C A G G C G G C A A A A G

序列号： 4 4

序列长： 4 8

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

A C C T T C C A G A T A C G A G C T C A C A T C G C T G G T

A A A G G T A C C T T C C G C A T G

序列号： 4 5

序列长： 3 6

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

A A T T C A T C G C G T G G C T G G T G A A A G G C C G T G

G T T A A G

序列号： 4 6

序列长： 5 3

序列类型： 核酸

链数： 单链

拓扑学： 直链状

序顺种类： 合成DNA

序列

T C G A C T T A A C C A C G G C C T T T C A C C A G C C A C

G C G A T G A A T T C T T T T G C C G C C T G

序列号： 4 7

序列长： 3 8

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

T G A A T T T C A G A A G C A T G C C G C T T A T G T C G A
G A A G G C C T

序列号：48

序列长：24

序列类型：核酸

链数：单链

拓扑学：直链状

序顺种类：合成DNA

序列

G A C T C A G A T C T T C C T G A G G C C G A T

说 明 书 图

图 1

5' AATTCATGAAATTCTGTTAAAAGCGTTCTGTTCTGAAT TCAGCTGATGCATAACCTGG
 3' GTACCTTAGACAATTTCGGCAAGACAAAGACTTAAACTGACTAC GTATTGGACC
 L7 U2
 GCAAACACCTGAAATTGCACTGG AACGGCGTCCAGTGGCTGCCGTAAGAAACTGCAGGACGCTCC
 CGTTTGACTTATCGTACCTTGGCAGCT CACCGAACCCATTCTTGTACCTCTGCAGG
 L6 U3
 AC AACCTTCGTTGGCTGGGTGCACCCGCTGGCTCCACCGTCATGCC AGCATCCCACCTCCCG
 TGTGAAAC GCGACCCACCTGGCGACCGAGGTCACACTACGGTT GCAGGGCG
 L4 U4
 CTAAAGAAAGATAAAGTCACT GGTTGAATCTCATGAGAAATCCCTGGGCAAGGCTGACA
 CATTCTTTCTTCTATTGCATGACCAACTAGAG TACTCTTAGGGACCCGCTTCACTGT
 L3 U5
 AA CCCGATGTTAACGTTGCTGACCAAGCGAAAGCCAGTAAG 3'
 TTCGGCTACAATT GCACCGACTGGTTGGCTTTCGGTCATTCACTGT 5'
 L2 U6
 L1 U7

2

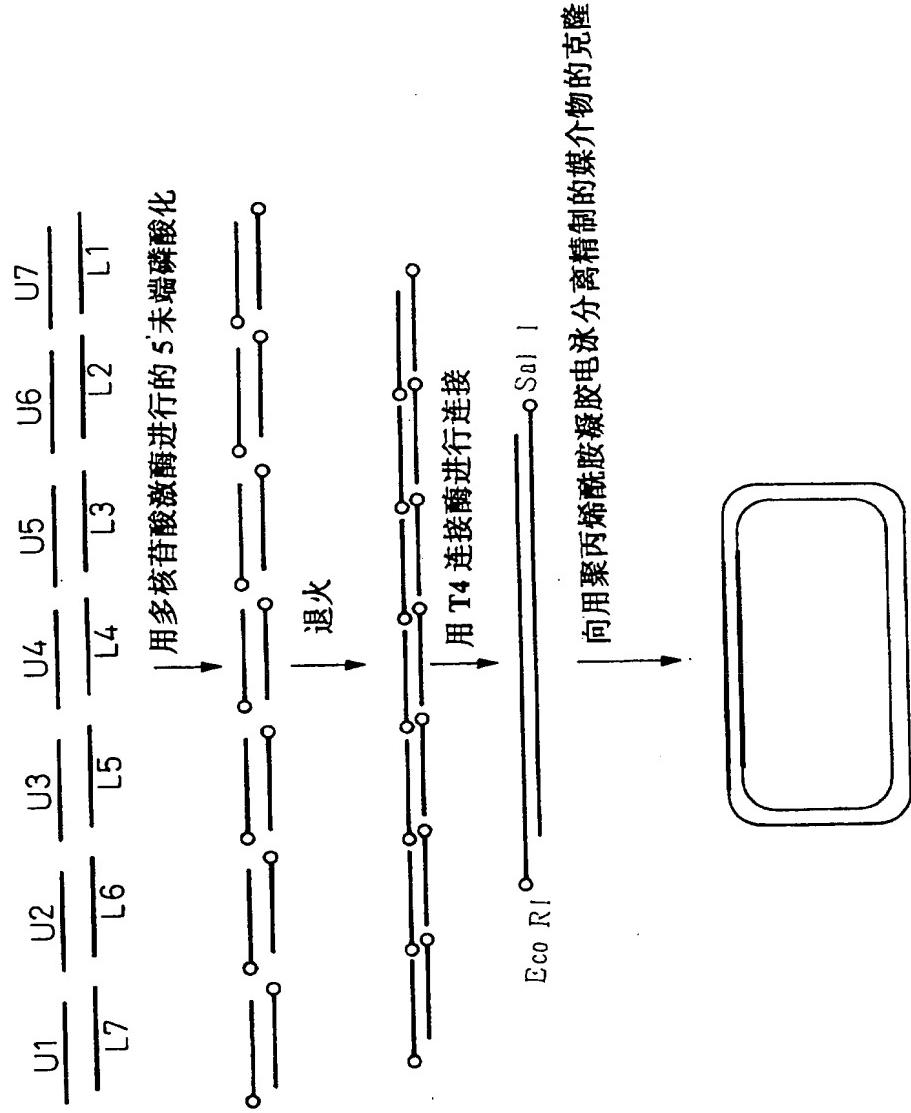


图 3

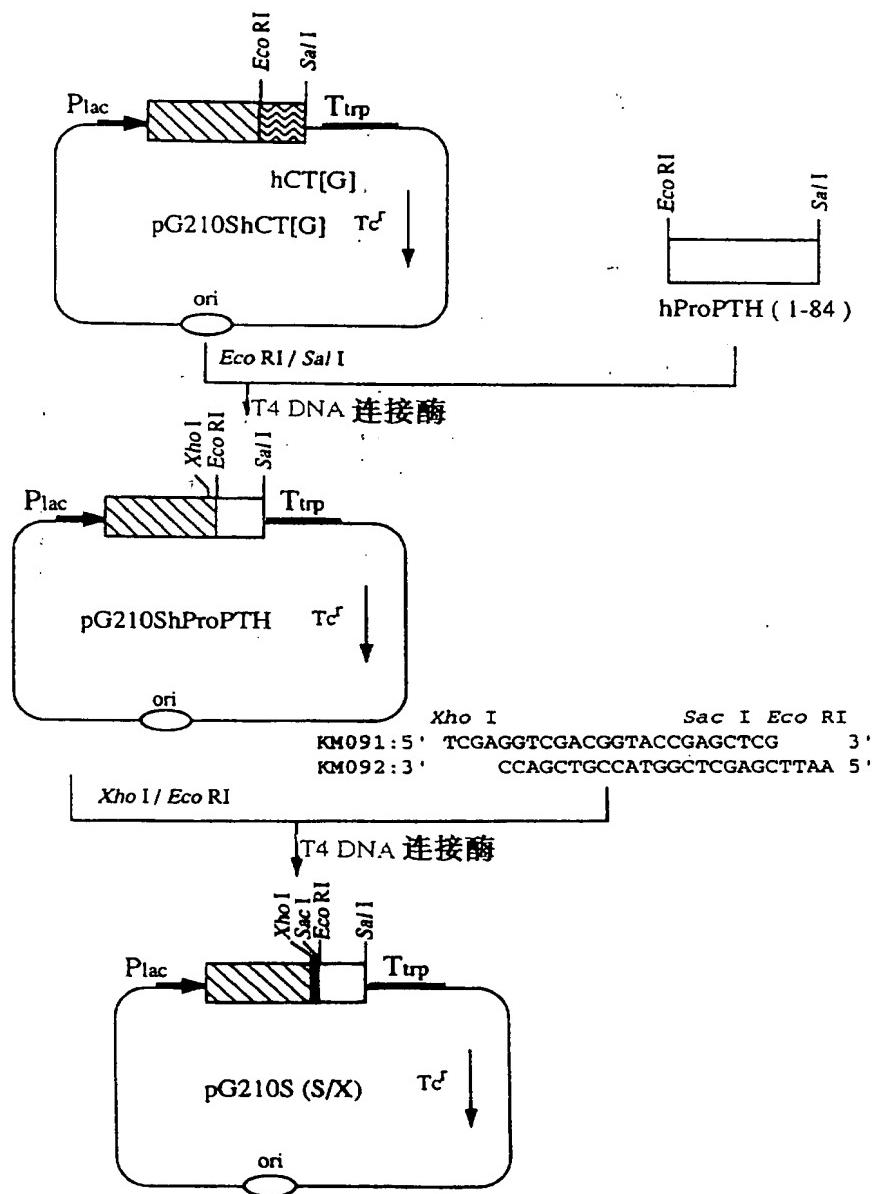


图 4

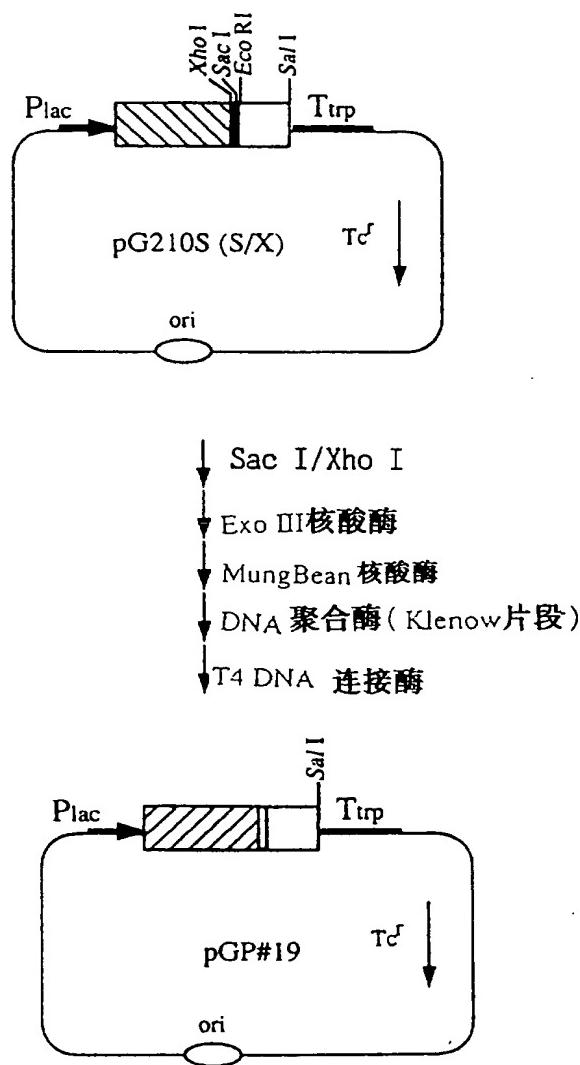


图 5

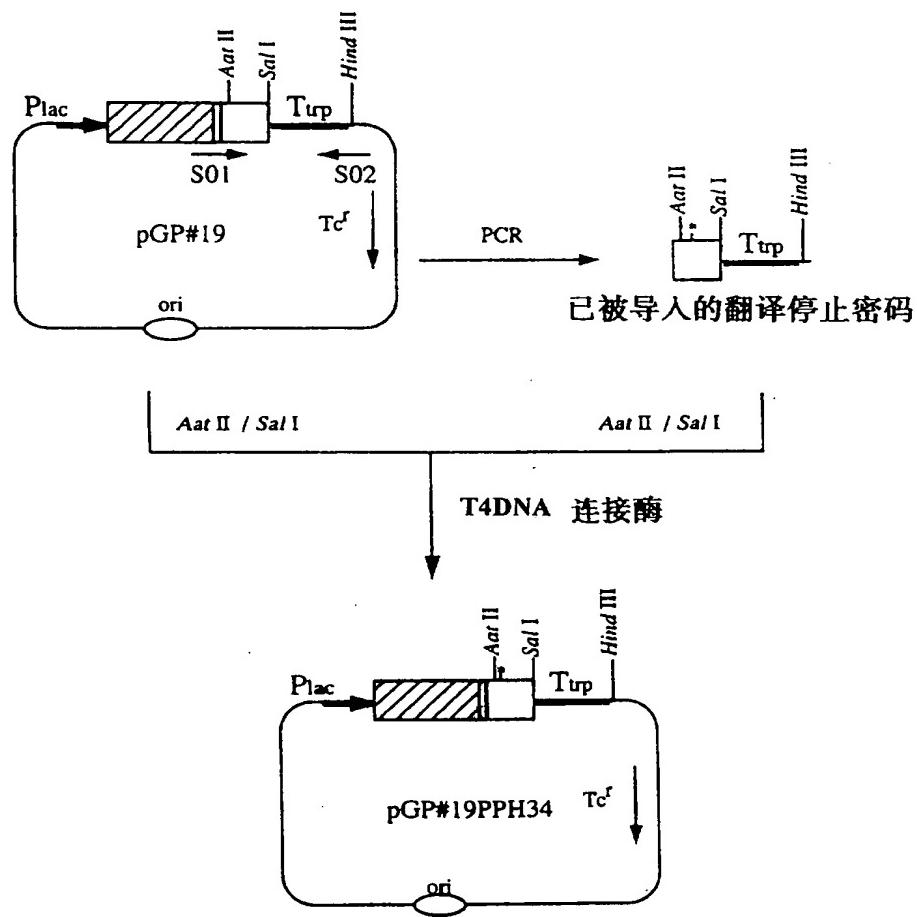


图 6

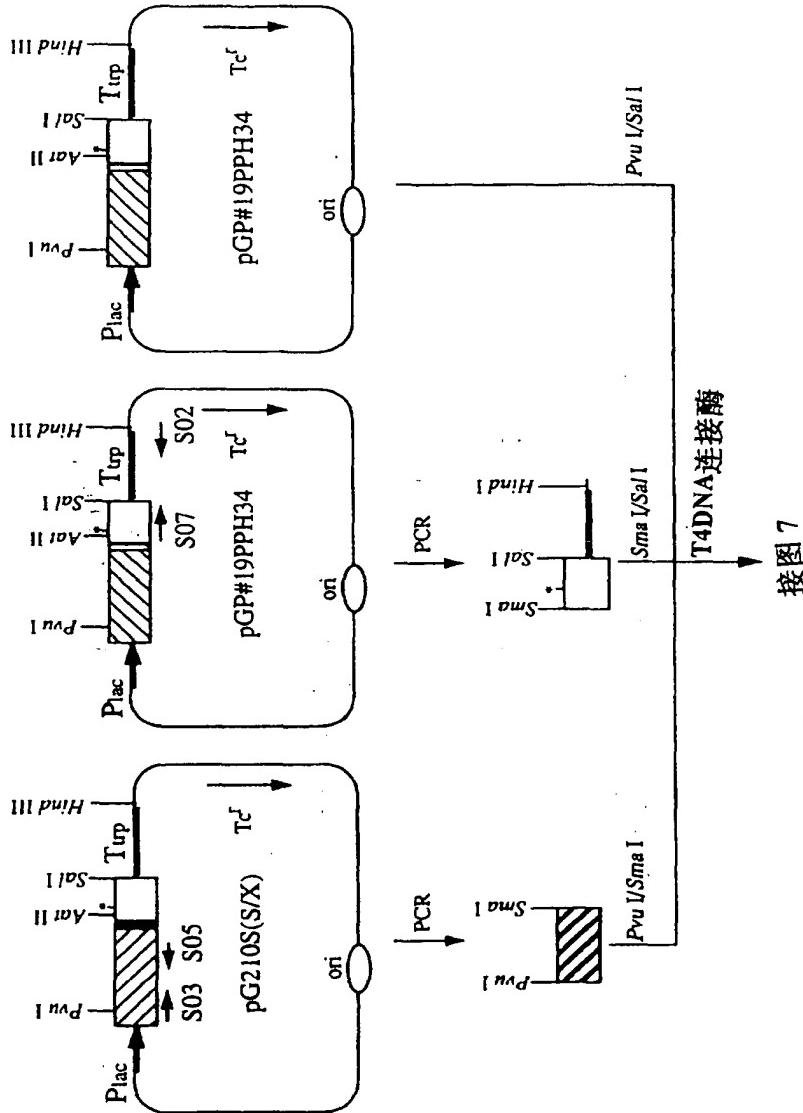


图 7

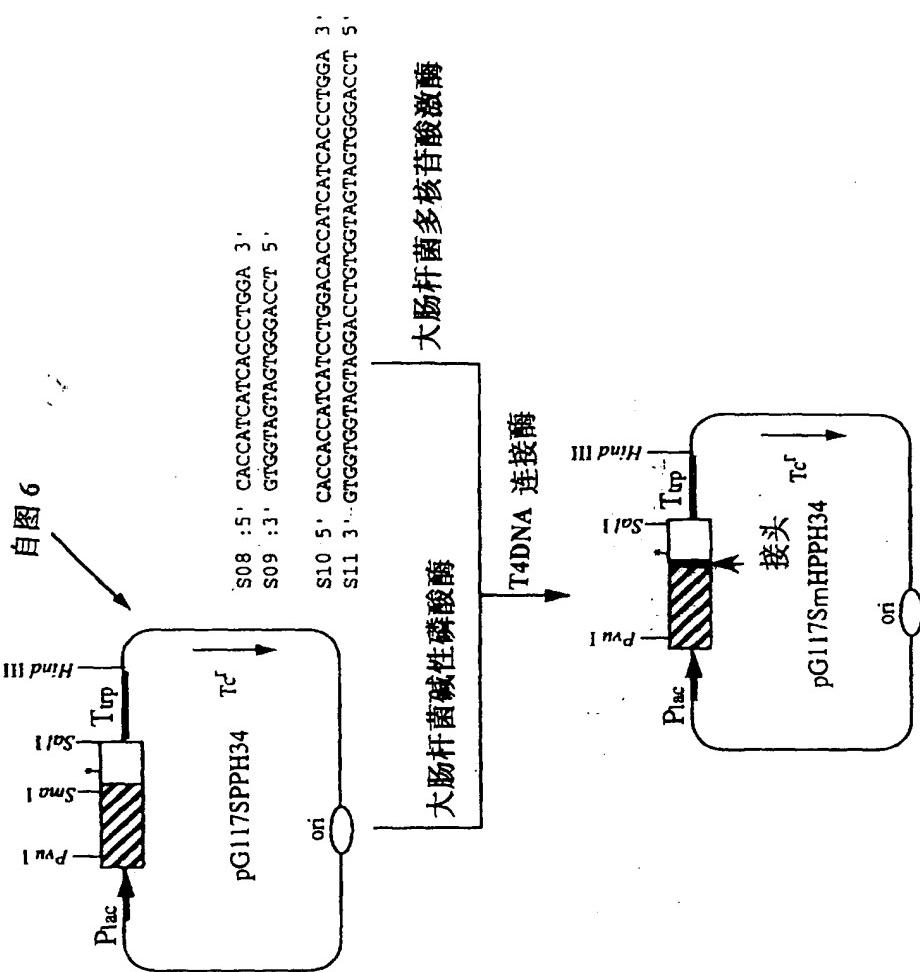
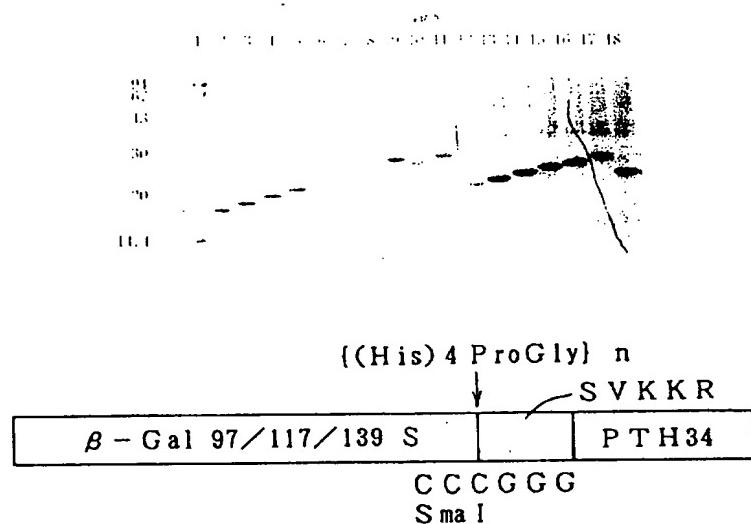


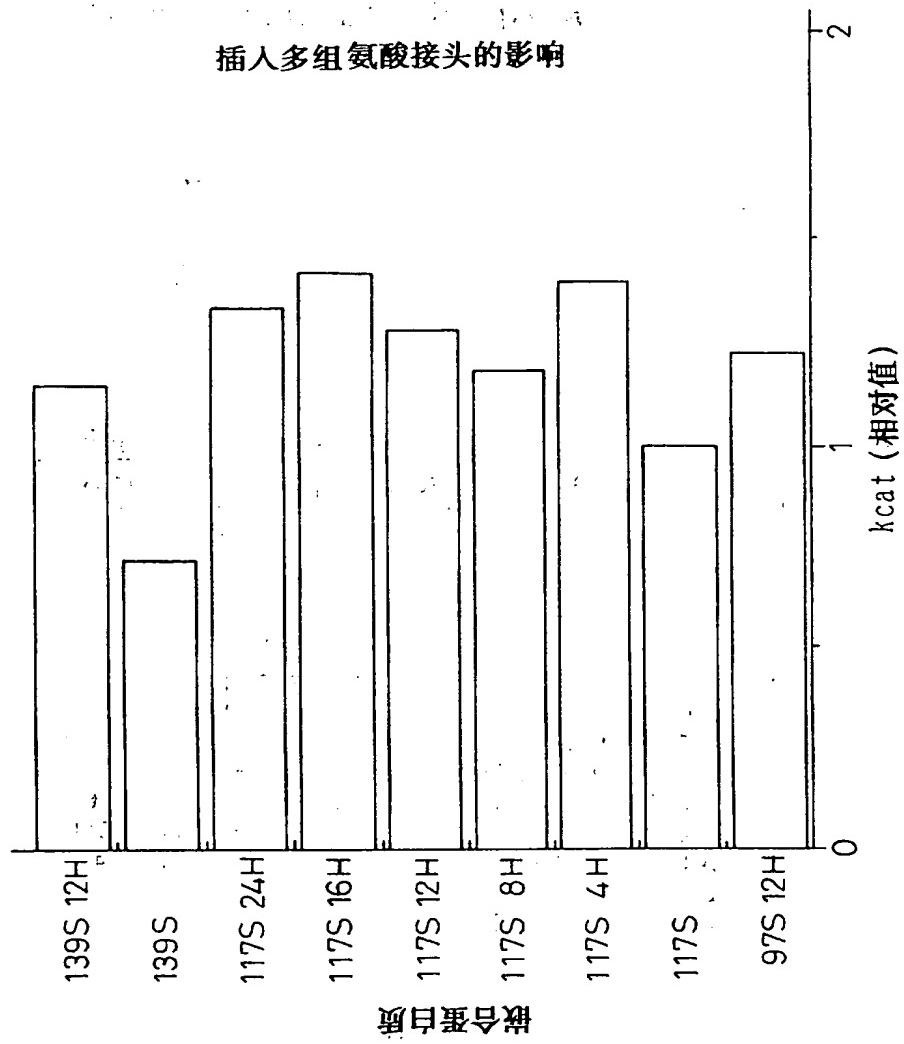
图 8
插入多组氨酸对 PTH 融合蛋白质生产率的影响



标准				
1				
2	β Gal 97S			12 β Gal 117S
3	β Gal 97S 4 H			13 β Gal 117S 4 H
4	β Gal 97S 8 H			14 β Gal 117S 8 H
5	β Gal 97S 12H			15 β Gal 117S 12H
6	β Gal 97S 4 K			16 β Gal 117S 16H
7	β Gal 97S hANP			17 β Gal 117S 24H
8	β Gal 139S			18 β Gal 117S 4 K
9	β Gal 139S 8 H			
10	β Gal 139S 4 K			
11	β Gal 139S 12H			

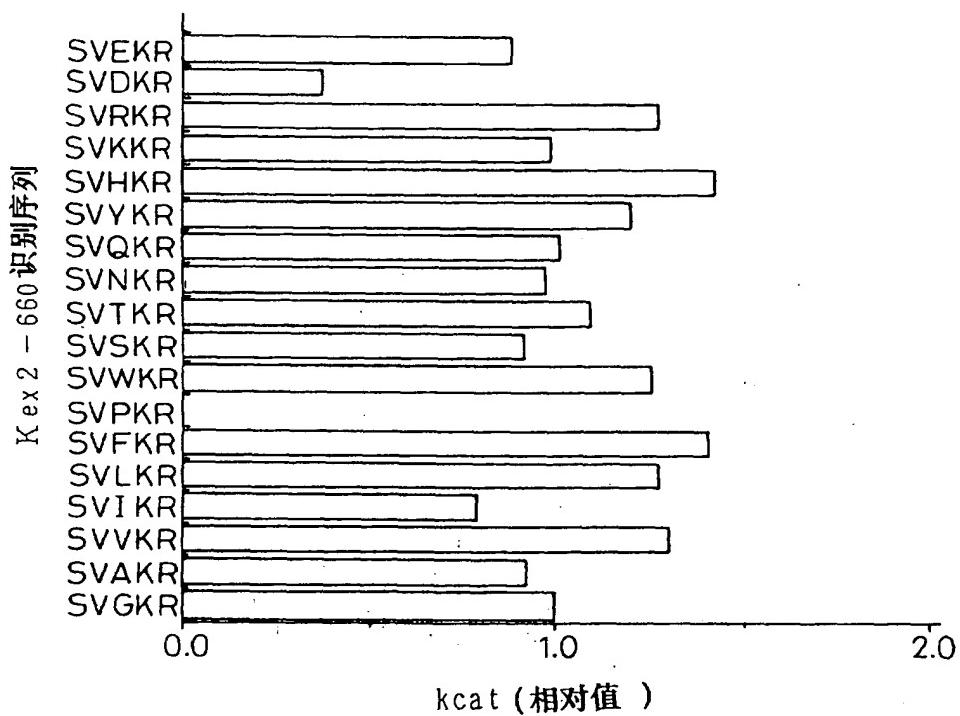
标准的分子量在图左端中以 kd 单位记载

图9



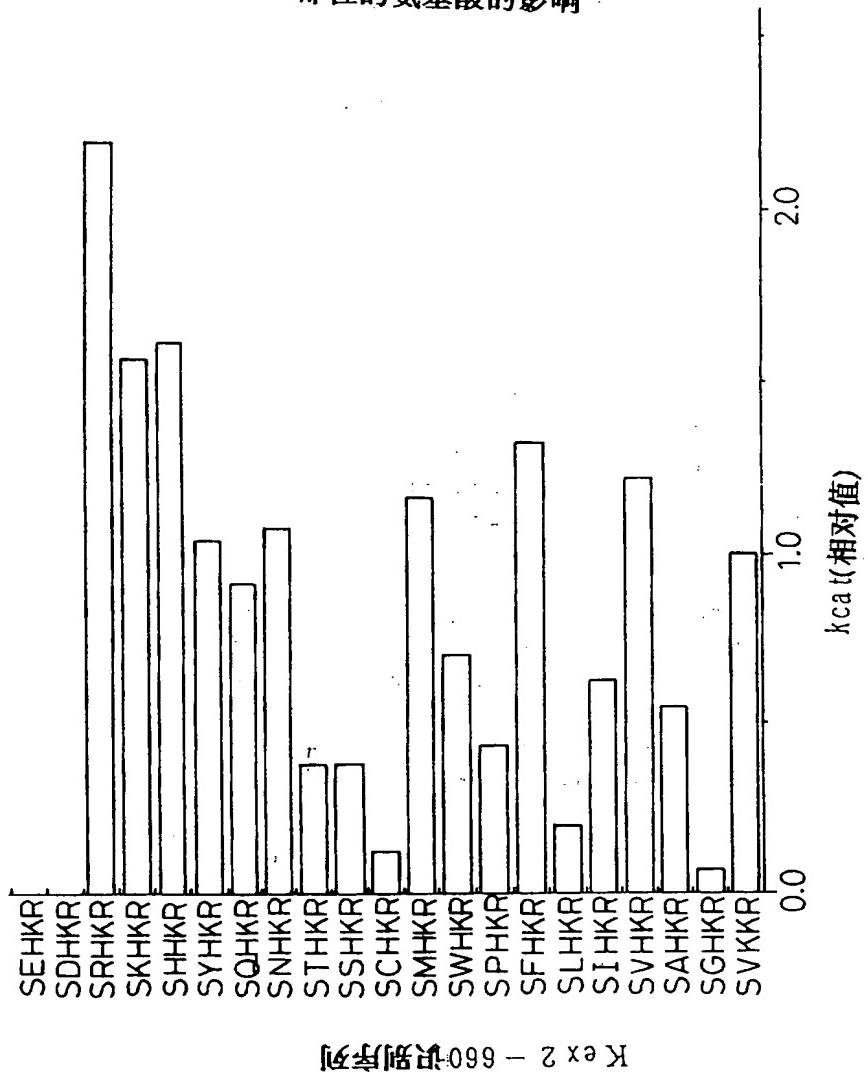
P3 部位的氨基酸的影响

图 10



P4 部位的氨基酸的影响

图11



Kex 2 - 660识别序列

图12

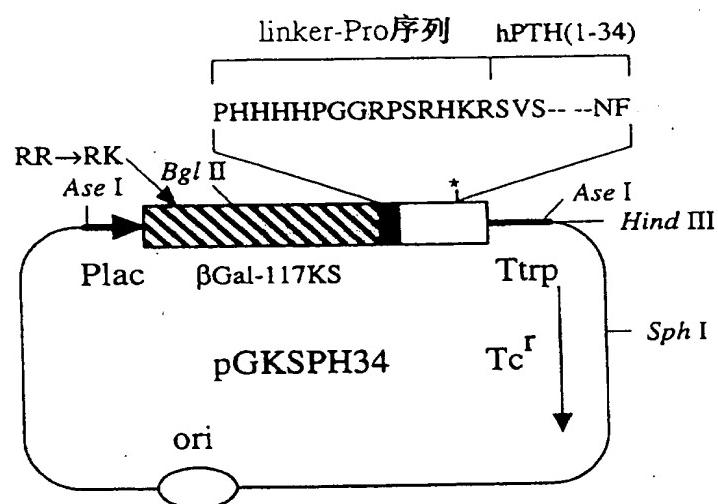


图 13

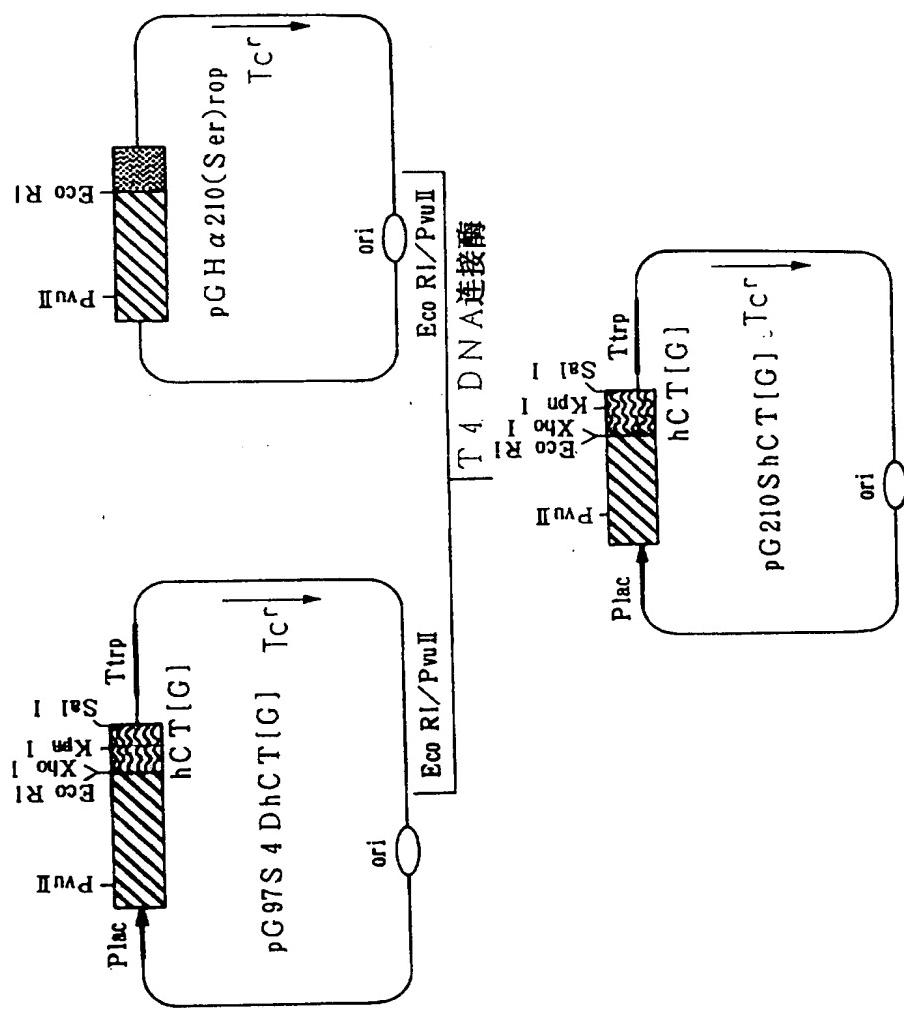


图 14

(a) GLP1-37[Gly]合成 DNA

GLP-1 5' CG GAA CCT ACC TTT ACC AGC GAT CTG AGC TCG TAT CTG GAA CCT CAC GCG GCA AAA G 3'
GLP-2 3' GTACGG CTT CCA TGG AAA TGG TCC CTA CAC TCG AGC ATA GAC CTT CCA 5'

GLP-3 5' AA TTC ATC GCG TGG CTG GTG AAA GGC CGT GGT TAA G 3'
GLP-4 3' GTC CGC CGT TTT CTT AAG TAG CGC ACC GAC CAC TTT CCG GCA CCA ATT CAGCT 5'

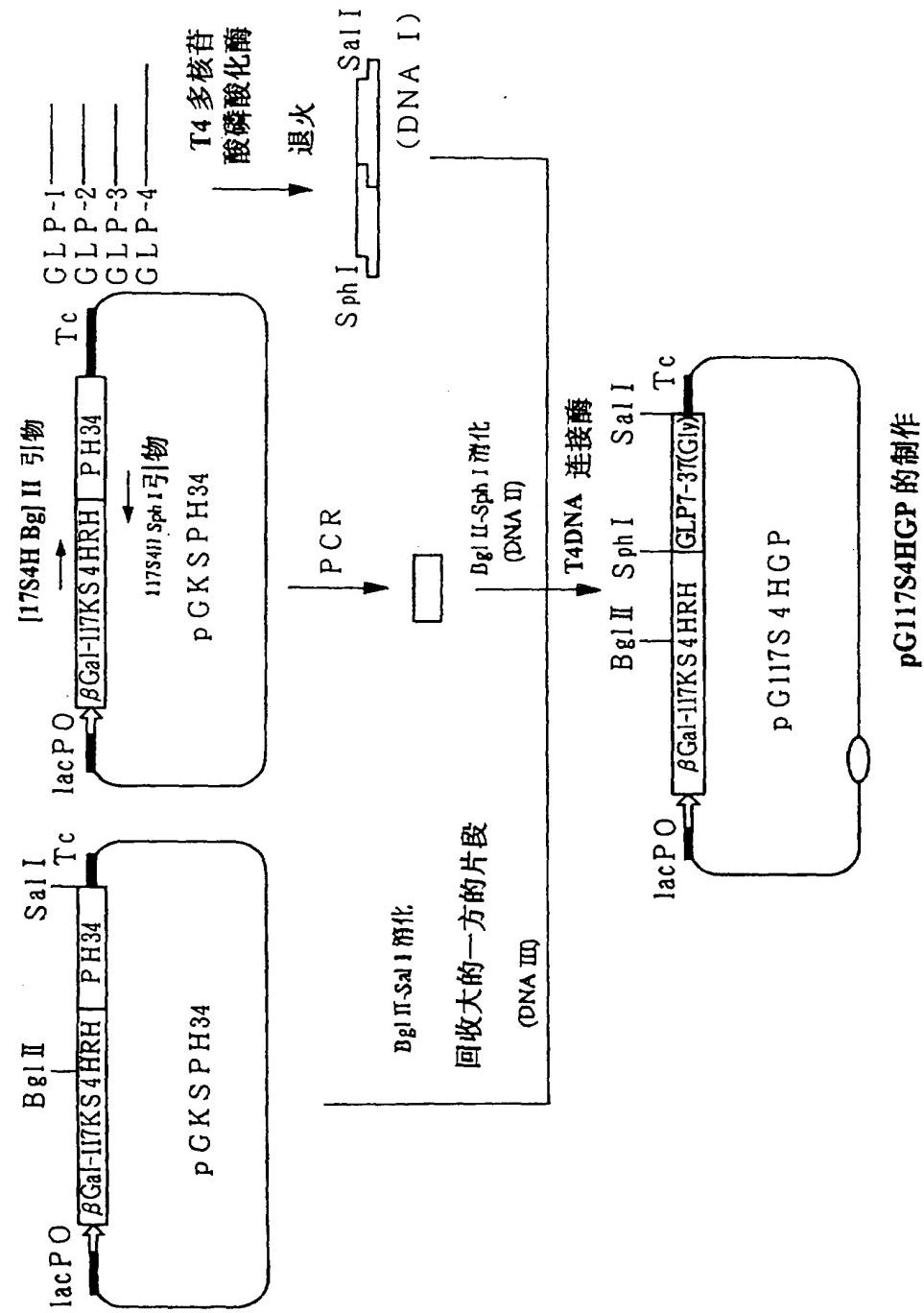
(b) PCR引物

117SAH Spa I 引物
5' TGA ATT TCA GAA GCA TGC CCC TTA TGT CGA GAA GGC CT 3'
Spa I

117SAH Bgl II 引物
5' GAC TCA GAT CTT CCT GAC GCC GAT 3'
Bgl II

合成 DNA 的碱基序列

图 15



pG117S4HGP 的制作

图.16

